جمهورية العراق
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة بغداد
معهد الهندسة الوراثية والتقنية الحيوية
للدراسات العليا

ألأحيــــــاء العلاجيـــــــة

(من اجل الحياة)

تأليف الدكتورة

زهرة محمود الخفاجي

2008

بِسْمِ ٱللَّهِ ٱلرَّحْمَٰنِ ٱلرَّحِيمِ

وَٱللَّهُ أَنزَلَ مِنَ ٱلسَّمَآءِ مَآءً فَأَحْيَا بِهِ ٱلْأَرْضَ بَعْدَ مَوْتِهَآ ۚ إِنَّ فِى ذَٰلِكَ
لَءَايَةً لِّقَوْمٍ يَسْمَعُونَ ﴿٦٥﴾ وَإِنَّ لَكُمْ فِى ٱلْأَنْعَٰمِ لَعِبْرَةً ۖ نُّسْقِيكُم مِّمَّا
فِى بُطُونِهِۦ مِنۢ بَيْنِ فَرْثٍ وَدَمٍ لَّبَنًا خَالِصًا سَآئِغًا لِّلشَّٰرِبِينَ ﴿٦٦﴾

صدق الله العظيم

سورة النحل / الاية 65-66

الإهداء

اللـــهم منــك .... و اليـــــك

ثم

الى وطني الحبيب (العراق) الذي غيبته المسافات
..... الساكن في القلب

الى ذكرى والدي رحمهما الله

الى رفيقي غربتي ..عثمان و نذير

شكر و تقدير

اود ان اشكر ابني اخي نذير وعثمان لما وفرا من جو ملائم لي لكتابة الكتاب وكذلك طبعهم مسودات الكتاب ومعالجة اشكال الكتاب بالحاسبة وفهرسته .

واقدم شكري الى عائلتي الطيبة لما قدموه من عون لأواجه الحياة ، كما اشكر الاخ علي عبيس عبد وغيث لطفي عارف والأخت هناء حسين والأخت ندى خالد من معهد الهندسة الوراثية والتقنية الحيوية للدراسات العليا / جامعة بغداد / العراق لعونهم الذي لا ينقطع عبر الاثير وتذليلهم المصاعب التي واجهتني... واشكر الدكتور عادل نوفل مدير المركز العربي للتعريب والترجمة والتأليف والنشر /المنظمة العربية للتربية والثقافة والعلوم / دمشق لتشجيعه وتذليله المصاعب التي واجهتني، واشكر الاخت غيثاء منصور / طالبة دكتوراه / جامعة دمشق / قسم علوم الحياة لمساعدتها وتشجيعها المنقط النظير ، واشكر الاخت الست وفاء (ام اياد) من مكتبة كلية الزراعة / جامعة دمشق لما قدمته من تسهيلات كبيرة .جزى الله الجميع عني الجزاء الاوفي انه نعم الولي والقادر على ذلك .

زهرة الخفاجي

حزيران / 2007

دمشق

المقدمة

احمد الله حمدا طيبا مباركا فيه ، احمده على ما اعطى وابتلى ، احمده حمدا كما ينبغي لجلال وجهه وعظيم سلطانه ، احمده حمد الشاكرين واشكره شكر الحامدين . واصلي واسلم على نبينا الكريم (صلى الله عليه وسلم) وعلى آله الطيبين الطاهرين واصحابه الغر الميامين ومن تبعهم باحسان الى يوم الدين ... وبعد

بين شح اكتنف معظم جوانب الحياة ووفرة في الغربة ومشاعرها وآلامها .. اعانني الله القوي العزيز ان اضع هذا العمل الذي اكون فخورة لو وصل الى نصف الكمال ، وذلك ان الكمال لله وحده عز وجل .. وان النقص مزية ابن آدم ولازمته وذريعته الـ (لو)

والكتاب بموضوعه يتناول اهم جوانب الحياة الا وهي الغذاء والصحة ... وقد اهتم الغرب بشكل كبير في العودة الى سابق العصر والأوان لتوظيف الغذاء المتوازن للحفاظ على صحته بعد ان طالها التدهور من كل جانب ... وللعرب والمسلمين الممارسات الاولى في هذا المجال ..اذ ان العرب في البادية تقدم للضيف التمر واللبن ، فالاول للغذاء والثاني للدواء لحفظ صحته في البيئة الغريبة التي يطئاها. ولا تزال الكثير من الممارسات تستعمل الاحياء العلاجية بناءا على التجربة وليس البحث العلمي . وقد شاع في العالم انه في المؤتمرات يقدم اللبن العلاجي بين الجلسات عزوفا عن المرطبات الصناعية وغيرها . وما هذا الا دليل على ان الله سبحانه قد حبا حياتنا بالكثير من الاشياء الطبيعية التي يجب ان تستعمل بدلا من الاشياء التي هي من صنع الانسان والتي دمرت الحياة وفي بدايتها الصحة .

يضم الكتاب اثنى عشر فصلا ، ركز فيه على الأحياء العلاجية Probiotics من مجموعة بكتريا حامض اللاكتيك التي تأتي في المقدمة ، إضافة إلى إشارات للأحياء الأخرى .

وبما إن بكتيريا حامض اللاكتيك تحتل الجزء الأهم من الأحياء العلاجية لذلك أدرجت لها فصول موسعة لفهم تصنيفها وايضها بشكل خاص وجوانبها الوراثية لانه يتعلق بصلب الموضوع وهو سلوكها كأحياء علاجية .

زهرة الخفاجي

حزيران /2007

دمشق

الأحياء العلاجية

الفصل الأول

الأحياء المجهرية وجسم الإنسان

الفصل الثاني

بكتريا حامض اللاكتيك

الفصل الثالث

البكتريا المنشطرة وبكتريا اخرى

الفصل الرابع

الأحياء العلاجية ومواصفاتها

الفصل الخامس

تطبيقات استعمال الأحياء العلاجية

الفصل السادس

القابلية المضادة للتطفير والتسرطن

الفصل السابع

الأحياء العلاجية واعتلالات الجسم

الفصل الثامن

علاقة الأحياء العلاجية بالجهاز التناسلي الأنثوي

الفصل التاسع

الأحياء العلاجية في عالم الحيوان

الفصل العاشر

الحياء العلاجية الأخرى

الفصل الحادي عشر

المنتجات العلاجية

الفصل الثاني عشر

تشريعات السلامة لاستعمال الأحياء العلاجية

الأحياء العلاجية

Probiotics

تعني كلمة Probiotics (من اجل الحياة) واشتقت أصلا عام 1965 لوصف الكائنات او الاحياء المجهرية Microorganisms التي تساعد نمو الاحياء الأخرى . وتلت ذلك وضع تعاريف أخرى لا تبتعد جوهريا عن بعضها ، منها التعريف الذي وضع من قبل مجموعة العاملين في المجال عام 1999 والذي يشير الى ان Probiotics هي مستحضرات من الخلايا الميكروبية او مكوناتها والتي عند تناولها تعود بالفائدة والتأثير الايجابي على صحة المضيف وبذلك فان المصطلح توسع أكثر من كونه خلايا حية الى مشتقاتها . وقد سبق ذلك وضع تعريف آخر عام 1998 من قبل Lactic Acid Bacteria Industrial Platform (LABIP) ينص على ان Probiotics هي أحياء مجهرية التي عند ابتلاعها بأعداد معينة (كثيرة) تؤدي الى تحسين الحالة الصحية للمضيف host .

ونتيجة للدراسات والنتائج الموسعة والنتائج الايجابية في اغلب الاحيان تبنت منظمة الصحة العالمية WHO ومنظمة الزراعة والأغذية FAO هذا الموضوع ووضعت التعريف العام الذي ينص على ان Probiotics هي خلايا حية قادرة على عبور المناطق العلوية من الجهاز الهضمي ولها القابلية على التكاثر في الامعاء والتي عند اعطائها بأعداد ملائمة تضفي التأثيرات الصحية على المضيف الذي يتناولها .

وفي اللغة العربية ونتيجة لعدم وجود مقابل لوصف كلمة Probiotics وضعت عدة مترادفات منها المعززات الغذائية او الاحياء العلاجية وغيرها ، ولعل الأفضل من حيث الجوهر والتلاؤم اللغوي هو استعمال الاحياء العلاجية التي ستستعمل في هذا الكتاب .

ويكون تناول الاحياء العلاجية في اغلب الاحيان عن طريق الاغذية لذلك فكانت بعض التعاريف تبرز هذه الناحية وتعرفها على انها الاحياء الموجودة في الالبان والاغذية او مدعماتها والحاوية على الخلايا بشكل حي Viable cells وتكون لها القابلية على تحسين النواحي الصحية ويكون تحسينها للنواحي الصحية بعدة طرق مثل تحسين التوازن في فلورا الامعاء Intestinal flora وغيرها من الطرق التي سيأتي ذكرها لاحقا في فصول الكتاب .

ويلحق عادة مصطلح Prebiotics مع الاحياء العلاجية وتستعمل في هذا الكتاب على انها مساعدات العلاج الحيوي وهي مكونات الغذاء غير قابلة للهضم من قبل المضيف ولها تاثير مفيد للمضيف سواء استعملت لوحدها او مع الاحياء العلاجية وذلك لانها تستعمل من قبل الاخيرة مؤدية الى نشاطها وتكاثرها خاصة في المناطق السفلى من القناة الهضمية مثل القولون Colon اي يكون

لها تاثير تآزري . وعند استعمال الاحياء العلاجية مع مساعدات العلاج الحيوي يطلق على الحالة تآزر العلاج الحيوي Synbiotic .

الفصل الاول

الاحياء المجهرية وجسم الانسان

الموضوع	الصفحة

الاحياء المجهرية و جسم الانسان

يحوي جسم الانسان على العديد من الاحياء المجهرية وتكون في حالة توازن مع بعضها وعند اختلاف علاقة التوا زن تظهر الامراض الناتجة عن الاصابة Infectious diseases ، اضافة الى ان الامراض الفسلجية Physiological diseases تظهر من اختلاف التوازن الفسلجي للجسم او اضطراب الجهاز المناعي ولذا لابد من ألقاء نظرة على فلورا الجسم الطبيعية Natural flora .

الأحياء المجهرية الطبيعية في الجسم

تقطن الاحياء المجهرية جسم الانسان او الحيوان في عدة مواقع من الجسم وتكون بحالة متعايشة معه في الحالات الاعتيادية ، ومن هذه المناطق الجلد والاغشية المخاطية التي تغطي تجاويف الانف وتجاويف الفم ، اضافة الى استعمارها او استيطانها Colonization للقناة الهضمية وخاصة الجزء الاسفل منها وتقطن ايضا القناة البولية التناسلية . ومن ناحية استعمال الاحياء العلاجية تستأثر القناة الهضمية بالاهتمام الاكبر تليها القناة التناسلية . ولذا سيتم التركيز على القناة الهضمية ثم في فصول اخرى ستدرس مناطق الجسم الاخرى .

فلورا الامعاء Intestinal flora

تمثل الامعاء وخاصة الغليظة نظام بيئي معقد تنشط فيها الاحياء من النواحي الايضية وتكون الاحياء في مكان قريب من الطبقة المخاطية الطلائية او الظهارية Epithelial للامعاء . وتتفاعل هذه الاحياء مع المواد الغذائية التي تصل اليها من الامعاء ويظهر الجدول التالي (جدول 1) بعض مجموعات البكتريا الموجودة في القناة الهضمية للانسان والاعداد التقريبية لها .

ويلاحظ من الجدول ان الجزء الاعلى من القناة الهضمية يحتوي على اعداد اقل ثم تبدا الاعداد بالزيادة ، ويمثل الجزء الاسفل من الامعاء الدقيقة مرحلة انتقالية بين منطقة تقل فيها اعداد الاحياء المجهرية (البكتريا) وبين جزء تزداد فيه الاعداد الى حد كبير وهو القولون ، ففي الجزء الاسفل من اللفائفي تكون الاعداد بين 10^{6}-10^{7} لكل مللتر او غرام من المحتويات ، اما في القولون فيصل الى 10^{11}-10^{12} / غم من مواد الغائط .

جدول 1 : مجاميع البكتريا الموجودة في القناة الهضمية للانسان بصورة طبيعية وتوزيعها

(وحدة تكوين المستعمرات Colony forming units / غم من المحتويات)

الموقع	المكونات	العدد الكلي
المعدة	*Streptococcus* *Lactobacillus*	10^{2} - 10^{4}
Duodenum and jejunum الاثنى عشري والصائم	*Streptococcus* *Lactobacillus*	10^{2} - 10^{4}
Ileal-ceca اللفائفي - الاعوري	*Bacteroides* *Clostridium* Streptococci Lactobacilli	10^{6} - 10^{8}
القولون		10^{11} - 10^{12}
	Bacteroides(10^{10}-10^{11}) *Clostridium* (10^{10}) *Eubacterium* (10^{10}) *Peptococcus* (10^{10}) *Bifidobacterium* (10^{9}-10^{10}) *Streptococcus* (10^{10}) *Fusobacterium* (10^{9}-10^{10})	

ان وجود هذه الاحياء واستعمارها للقناة الهضمية يحدث بعد الولادة ، ويعتمد على مدة الحمل وطبيعة الولادة والتغذية التي يغذى بها الوليد. فمن المعروف ان الجنين اثناء الحمل يكون محاطا ببيئة معقمة ولكن بعد الولادة مباشرة (بعد 10 دقائق) في الاطفال المولودين ولادة طبيعية وجد ان الفم يحوي على *Fusobacterium* , *Peptostreptococcus* , *Propionibacterium* , *Bifidobacterium* , *Lactobacillus* , *Enterococcus* *Bacteriodes* وانواع اخرى من افراد العائلة المعوية ، في حين ان الاطفال اللذين ولدوا ولادة قيصرية عزلت من أفواههم *Propionibacterium* و *Enterococcus* في معظم الاحيان مما يرجح ان البكتريا في بيئة الأمعاء للام تدخل عن طريق الفم . وقد وجد بعد مرور 48 ساعة من الولادة ان القولون يحوي

على 10^{9}-10^{11} بكتريا / غم من محتوى القولون ، وهي مكونة أساسا من البكتريا المعوية Enterobacteria والعنقوديات Staphylococci والمسبحيات المكورة Streptococci . وتظهر البكتريا المنشطرة Bifidobacteria بعد مرور 4 - 5 ايام وتصبح هي السائدة وتصل اعدادها الى 10^{10}-10^{11}/ غم من الغائط في حالة الرضاعة الطبيعية ، وبعد أسبوع تصل نسبتها الى 99 % من فلورا الغائط، في حين ينخفض مستوى البكتريات الأخرى مثل *Escherichia coli* والعصيات اللبنية والمكورات المعوية حوالي 1000 مرة وتختزل أعداد معظم الاحياء اللاهوائية وبكتريا التفسخ وربما تختفي .

وعليه فان البكتريا تأتي من مهبل الام وكذلك فلورا الغائط ولذا يكون الغزو الميكروبي الأول للأطفال حديثي الولادة هو القناة التناسلية للام (التي سيأتي ذكرها في الفصول القادمة) .

العوامل المؤثرة على استعمار الامعاء

هناك عددا من العوامل التي تؤثر في استيطان واستعمار الامعاء من قبل الاحياء المجهرية ومنها :

- طريقة الولادة ، أذ تؤثر بشكل كبير فالولادة الطبيعة تعرض الجنين بعد خروجه من بيئته المعقمة الى بيئة المهبل ونهاية القناة الهضمية للام والحاوية على أعداد كبيرة من الاحياء التي تدخل عن طريق الفم الى الامعاء .
- نضج واكتمال الجنين ، فولادة الخدج Premature تؤدي الى صعوبة استعمار الامعاء بالبكتريا المفيدة ومنها البكتريا المنشطرة وذلك لنقص المستلمات على سطح الخلايا وانعدام بعض المواد الأساسية داخلية المنشأ . لذلك يكون هؤلاء الاطفال عرضة لاستعمار أمعائهم وخاصة القولون من قبل بكتريا معوية اخرى وكذلك جنس *Bacteriodes* .
- طريقة التغذية وتكون الرضاعة الطبيعية من الثدي مشجعة لوجود البكتريا النافعة مثل البكتريا المنشطرة ويلاحظ ذلك في غائطهم الذي يكون حبيبي القوام ورقمه الهيدروجيني يتراوح بين 4.8 -5.4 ويكون برائحة الخل نظرا لكثرة البكتريا المنشطرة التي تنتج حامض الخليك (كما سيأتي ذكره لاحقا) اما ذوي الرضاعة الصناعية فيكون محتوى أمعائهم مشابه للبالغين وبرقم هيدروجيني 6.4 - 7.0 الذي يشير الى وجود احياء التعفن والجدول (2) يوضح محتوى غائط الاطفال ذوي الرضاعة الطبيعية مقارنة بمحتوى الغائط لأطفال الرضاعة الصناعية .

جدول 2 : مقارنة بين فلورا الغائط لاطفال الرضاعة الطبيعة والرضاعة الصناعية

(الاعداد تمثل لوغاريتم عدد وحدات تكوين المستعمرات / غم او مللتر من المحتويات)

البكتريا	رضاعة طبيعية	رضاعة صناعية
Enterobacteriaceae	8.6	9.5
Streptococcus	7.9	9.8
Staphylococcus	5.8	5.5
Lactobacillus	7.0	5.9
Bifidobacterium	10.7	10
Eubacteria	3.1	7.3
Bacteroidaceae	6.1	9.9
Peptococcaceae	2.4	7.9
Cl. perifringens	1.0	6.4
Clostridium spp	1.3	6.9
Veillonella	5.8	5.9

وبعد الفطام يحصل تغيير كبير في فلورا الغائط فبعد اول رضعة صناعية او تناول الطعام العادي تقل نسبة البكتريا المنشطرة الى احياء التعفن او تنقلب النسبة . والحقيقة لا توجد أي وصفة غذائية صناعية يمكن ان تؤدي الى النتيجة التي يتم الحصول عليها من الرضاعة الطبيعية

فمعرفة فلورا الامعاء وتحولاتها لها اهمية كبيرة من النواحي الصحية . وقد كانت الطرق تعتمد على عد الاحياء في الغائط ، ولكن هذه لا تعطي صورة واضحة وذلك لان العديد من الانواع الملتصقة قد يغطى تعدادها بهذه الميزة لذلك تم استخدام الخزع الحيوية Biopsies لعد الخلايا ، ومن جهة اخرى فان العديد من الاحياء ومنها البكتريا لا يمكن عدها نظرا لكونها غير قادرة على النمو في الأوساط الزرعية Unculturable ، لذلك استعملت طرق اخرى مثل تحديد كمية DNA باستعمال مسابر Probes لقياس DNA او غيرها من الطرق التي تهدف لتحديد DNA واقرانها باستعمال المواد المعلمة ، كما أمكن الاستدلال على احياء معينة بصورة غير مباشرة وذلك بقياس الهيدروجين في الزفير ، والطرق الاخرى تعمد الى قياس الانزيمات في الغائط ، وعلى العموم فان اخذ صورة اكثر وضوحا عن الانواع والاعداد يكون باقران اكثر من طريقة .

والاستعمار الاول للامعاء يبدا كما ذكر اعلاه عند الولادة واثناء الاسبوع الاول وتكون الفلورا مشابهة للفلورا الموجودة في المهبل والثدي والغذاء الذي يأخذه الرضيع . وقد وجد ان أول الاحياء

التي تستعمر أمعاء الرضيع هي *E. coli* وافراد من جنس *Streptococcus* وتتراوح اعدادها في الاسبوع الاول بين 10^{8}- 10^{10} / غم من غائط الرضيع ، يلي ذلك ظهور الاحياء اللاهوائية مثل *Bifidobacterium* و *Clostridium* و *Bacteriodes* .

وفي حالة رضاعة الثدي الطبيعية تختزل اعداد بكتريا القولون (*E. coli*) والمسبحيات المكورة ، ثم يحصل اختفاء جزئي او كلي للبكتريا *Clostridium* و *Bacteriodes* ويرافقه طغيان للبكتريا المنشطرة . اما في حالة الرضاعة الصناعية Bottle feeding فلا يحصل اختزال او اختفاء للاحياء المذكورة اعلاه مما يؤدي الى تكوين فلورا ميكروبية معقدة . وتبقى الفلورا الطبيعية بسيطة في حالة الرضاعة الطبيعية الى ان يتغير نظام تغذية الطفل وتعود بكتريا القولون والمسبحيات والكلوستريديا للظهور ويمكن عزلها من الغائط وبإعداد مشابهة للفلورا في اطفال الرضاعة الصناعية . وتحصل تغيرات من فلورا أمعاء الاطفال اثناء السنة الثانية لتصبح مشابهة لفلورا البالغين . وفي البالغين قدر ان فلورا الامعاء تصل من 1-2 كغم والتي قد تماثل وزن بعض أعضاء الجسم الموجودة في الانسان ، فأمعاء الانسان تأوي حوالي 10^{14} من البكتريا لكل غرام من المحتويات وهذه تزيد عن تعداد الخلايا في الجسم الطبيعي . وتصل الانواع الى حوالي 500 نوع . وتقسم حسب شيوعها في الامعاء الى :-

1- احياء شائعة وهي التي تؤثر على صحة الجسم .

2- احياء اقل شيوعا والتي تشكل حوالي 1% من التعداد البكتيري الكلي ومع قلتها فانها تلعب دورا هاما في توازن النظام البيئي للامعاء ويمكن اخذ صورة عن تعداد البكتريا في مختلف المراحل العمرية كما موضح في الجدول (3) .

يلاحظ ان للعمر تأثيرا كبيرا على فلورا الامعاء ويشاركه في التاثير الغذاء ، والعاملان يساعدان على نضج الجهاز الهضمي وتكامله .

العوامل المؤثرة في توزيع الفلورا

تتوزع الفلورا بنمط يتأثر بالظروف المحيطة سواء من حيث الانواع والاعداد ، فهي يمكن ان تتأثر بالظروف الفيزياوية والكيمياوية والحيوية ومن هذه العوامل :

1 - حركة الأمعاء الدودية Intestinal peristaltisms وتؤدي الى دفع الاحياء الى خارج الجسم .

2 - المعدة بحموضتها تساعد في الحفاظ على تعداد واطئ من البكتريا في الجزء العلوي من القناة الهضمية وتدمر معظم الاحياء المرضية .

3- تتداخل الانواع البكتريية المختلفة بشكل يؤدي الى الحفاظ على التوازن فيمكن ملاحظة حالة التعايش Symbiosis وتبادل المنفعة Mutualism وظاهرة التضاد

Antagonism التي تتم نتيجة انتاج المضادات الحيوية Antibiotics او البكتريوسينات Bacteriocins وعوامل اخرى مثل الحوامض الدهنية الطيارة Volatile fatty acids .

جدول 3 : توزيع المجاميع البكترية وفق الفئات العمرية (الأعداد تمثل لوغاريتم لوحدة تكوين المستعمرات cfu /غم او مللتر من المحتويات)

البكتريا	اطفال رضع 1-4 يوم	اطفال رضع 5- 90 يوم	اطفال 4-6 سنوات	بالغين 20- 64 سنة	بالغين 65- 86 سنة
عدد البكتريا الكلي الهوائية و اللاهوائية الاختيارية	10.1	10.5	10.8	10.8	10.5
بكتريا معوية	9.3	8.8	8.0	8.2	7.8
Streptococcus	8.5	8.1	7.8	7.7	8.2
Lactobacillus	6.4	7.3	7.0	6.7	8.0
Staphylococcus	6.2	6.8	4.0	4.4	4.3
خمائر	3.5	4.0	4.2	3.7	4.6
البكتريا اللاهوائية					
Bacteroides	8.6	8.2	10.4	10.3	10.0
Eubacteria	0	9.7	9.9	9.9	9.5
Bifidobacterium	9.3	9.9	10.1	9.8	9.4
Peptococcus	0	9.0	8.1	8.9	7.7
Clostidium perfringens	5.9	6.9	5.7	4.8	6.6
Veillonella	5.6	6.3	5.2	4.8	6.1

4 - يؤثر الموقع في الجسم على نوعية الاحياء التي تستوطنه ، لذلك تكون البكتريا المستوطنة او المستعمرة له متخصصة من مناطق معينة ، وهذا يعني انه على طول القناة الهضمية يوجد تغاير نوعي وكمي للفلورا الموجودة والجدول (4) يعطي صورة عن هذا التغاير.

جدول 4 : توزع الفلورا على مواقع مختلفة في جسم الانسان(الأعداد وحدة تكوين المستعمرات لكل غرام من محتوى جزء القناة الموضح)

العضو	**المعدة**	**الصائم**	**اللفائفي**	**القولون**
الهوائيات المجبرة واللاهوائيات الاختيارية				
Enterobacteria	$0 - 10^{2}$	$0 - 10^{3}$	$10^{2} - 10^{5}$	$10^{5} - 10^{10}$
Streptococcus	$0 - 10^{3}$	$0 - 10^{4}$	$10^{2} - 10^{6}$	$10^{5} - 10^{10}$
Staphylococcus	$0 - 10^{3}$	$0 - 10^{3}$	$10^{2} - 10^{5}$	$10^{4} - 10^{7}$
Lactobacillus	$0 - 10^{3}$	$0 - 10^{4}$	$10^{2} - 10^{5}$	$10^{6} - 10^{10}$
البكتريا اللاهوائية				
Bacteriodes	نادرة	$0 - 10^{2}$	$10^{3} - 10^{6}$	$10^{10} - 10^{12}$
Bifidobacterium	نادرة	$0 - 10^{3}$	$10^{3} - 10^{7}$	$10^{8} - 10^{12}$
Peptococcus	نادرة	$0 - 10^{3}$	$10^{3} - 10^{4}$	$10^{8} - 10^{12}$
Clostridium	نادرة	نادرة	$10^{2} - 10^{4}$	$10^{6} - 10^{11}$
Fusobacterium	نادرة	نادرة	نادرة	$10^{9} - 10^{10}$
Eubacteria	نادرة	نادرة	$10^{3} - 10^{5}$	$10^{9} - 10^{12}$
Veillonellae	نادرة	$0 - 10^{2}$	$10^{3} - 10^{4}$	$10^{3} - 10^{4}$

ويلاحظ من الجدول كثرة الاحياء الهوائية في الجزء الاعلى ، تليه منطقة تكثر فيها الاحياء اللاهوائية الاختيارية (هوائية - لاهوائية) اذ تقوم الاحياء في هذه المنطقة الانتقالية باستخدام كل بقايا الأوكسجين الموجودة مما يؤدي الى خلق ظروف أكسدة واختزال (Redox) ملائمة للاهوائيات لاستيطان الاجزاء السفلى من القناة الهضمية ومنطقة القولون التي تقسم الى :-

1- القولون الصاعد ويكون حاويا على بكتريا موجبة لصبغة كرام (Gram positive) التي لها دور أساسي في تخمير السكريات .

2- القولون النازل و الفلورا فيه بشكل أساسي من النوع المحللة للبروتينات (بكتريا الإنتان) من البكتريا السالبة لصبغة كرام (Gram negative) ولكن توجد بكتريا من الموجبة لصبغة كرام مثل *Clostridium* و *Bacteroides* .

5 - البكتريا الخارجية وهذه عند دخولها الى الجسم يمكن ان تؤثر بشكل سلبي او ايجابي على فلورا الامعاء وكذلك على المضيف ، فهي قد تكون مدخلة لأغراض علاجية ، او تكون قد دخلت عرضا وتولد الأمراض .

التأثيرات الايجابية للفلورا الطبيعية

ان الكم الهائل من الاحياء الموجودة بشكل طبيعي لابد ان يكون له دور في ادامة صحة المضيف فهو يوفر حماية كبيرة للجسم ومن الجوانب الايجابية التي تظهرها الاحياء الطبيعية :-

1- تعد مصدرا لبعض المغذيات اذ ان العديد منها ينتج ألثامين Thiamine والرايبوفلافين Riboflavin وحامض الفوليك Folic acid وفيتامين B_{12} Cyanocobalamineوحامض البنتوثينيك Pantothenic acid . وغيرها من مجموعة فيتامينات B ، إضافة الى إنتاجها الحوامض الدهنية قصيرة السلسلة Short-chain fatty acids (SCFA) التي تحفز حركة الامعاء، وحوامض امينية وبروتينات يمكن ان تمتص وتستعمل من قبل المضيف لذا توجب إعطاء الفيتامينات عند العلاج بالمضادات الحيوية لتعويض بعض النقص الحاصل من قتل الاحياء المفيدة عند العلاج بالاخيرة .

2- التأثير الفسلجي وفي هذه الحالة تؤثر الفلورا الطبيعية على الشكل الخارجي للطبقة المخاطية Mucosa للأمعاء وكذلك تؤثر على تمايز الخلايا الطلائية ، وتؤدي الى زيادة بعض الإنزيمات مثل β-galactosidase والإنزيمات المحللة للسكريات الثنائية Disaccharidases والفوسفيتز القاعدي Alkaline phosphatase وغيرها ، لذلك فهي تساعد في قبط Uptake المغذيات وخلق نظام بيئي متوازن .

3- تلعب الاحياء الطبيعية دورا مهما في التأثير على الجهاز المناعي كما في تأثيرها على نضج الخلايا في جيوب باير Peyer's patches اذ انه في الامعاء تقوم الفلورا بالتزويد المستمر والمتكرر للمستضدات Antigens مما يؤدي الى جعل الجهاز المناعي نشط طوال حياة الانسان .

4- التأثير على الأورام ، فمن المعروف ان 90 % من المسرطنات Carcinogens في الانسان تسببها البيئة ومن اهمها الأغذية فهي تساعد في التقليل من خطر تطوره كما سيأتي ذكرها لاحقا .

5- التأثير على الإصابات الخارجية خاصة المعوية ، إذ تمثل احد خطوط الدفاع الأولى للجسم ضد الاحياء المرضية الخارجية فاستيطان الامعاء بالأحياء الطبيعية يجعل الاحياء المرضية دون أهمية سريرية فضلا عن منعها لاستيطان الامعاء ويتم ذلك بعدة وسائل والاليات .

أهم البكتريا في جسم الانسان

سبق وان ذكر ان أمعاء الانسان تحتوي على ما يقارب 500 نوع وتكون بتوازن داينميكي مع بعضها البعض وكذلك مع المضيف . ويلاحظ ان الاحياء اللاهوائية تزيد على الاحياء اللاهوائية الاختيارية بنسبة حوالي 1:1000 . ومن الفلورا الطبيعية أنواع عديدة من بكتريا حامض اللاكتيك سواء العصوية مثل جنس العصيات اللبنية *Lactobacillus* او المكورات مثل المكورات المعوية Enterococci وكذلك البكتريا المنشطرة .

ومن البكتريا المفيدة هي جنس العصيات اللبنية *Lactobacillus* *ويوجد* منها *Lb. acidophilus* بعدد حي يتجاوز 10^6 /غم من محتوى الامعاء . وبكتريا *Lb.fermentum* *بعدد* حوالي 10^4 و *Lb. plantarum* بعدد حوالي 10^7 ، واضافة الى ذلك توجد انواع اخرى باعداد اقل مثل *Lb. brevis* ، *Lb. casei* ، *Lb. leichmanii* ، *Lb. minutus* *Lb. rogosae* وبطبيعة الحال تخلو الامعاء من *Lb. bulgaricus* و *Streptococcus thermophilus* المستعملة في صناعة اللبن الرائب Yoghurt . وتحتوي الامعاء ايضا على انواع اخرى من العصيات اللبنية غير المشخصة . وقد عزلت من الغائط لاكثر من 90 % من الاصحاء وحوالي 85 % من ذوي التغذية النباتية .

والاحياء العلاجية تتكون بشكل كبير من العصيات اللبنية والبكتريا المنشطرة وبعض المكورات . ويجب ان تتصف الاحياء العلاجية بعدة مواصفات تؤهلها للعمل في الامعاء . وقد وضعت عدة مواصفات للاحياء العلاجية كي تقبل بهذه الصفة وهي تعتمد على المضيف والجزء المستهدف منه ، وتاتي القناة الهضمية كهدف رئيس للعلاج بالاحياء العلاجية وهناك اهداف اخرى مثل القناة التناسلية والقناة التنفسية وتاتي بدرجة اقل من القناة الهضمية ومن هذه المواصفات العامة :

1- ان تكون معزولة من جسم الانسان لتلافي العديد من المشاكل اللاحقة

2- ان تكون قادرة على العيش والتكاثر والإقامة في المضيف وخاصة الجزء المستهدف وسريعة التكاثر لتتغلب على الاحياء الاخرى .

3- ان تكون غير مرضية وغير منتجة للسموم .

4- ان تخلـــو مـــن القابليـــة التطفيريـــة Mutagenicity والتـــسرطنية Carcinogenicity وانما تكون مضادة لهذه القابليات .

5- ان تكون مؤثرة بشكل ايجابي على الجهاز المناعي للمضيف ولا تسبب الحساسية والالتهابات حتى في الاشخاص منقوصي او معلولي المناعة Immunocompromized

6- ان تكون لها القابلية للتضاد مع الاحياء المرضية أي لها القابلية على انتاج المواد المضادة للميكروبات Antimicrobials .

7- ان تكون ثابتة من الناحية الوراثية وان يقل فيها انتقال الصفات الأفقي .

8- ان تكون لها مسارات ايضية ملائمة .

9- ان تكون ذات علاقة ملائمة ومعينة مع المضادات الحيوية .

10- ان تكون لها القابلية للتنافس مع الاحياء الموجودة في الجسم .

11- ان تكون لها القابلية على نقل وتوصيل البروتينات والبيبتيدات المهندسة وراثيا .

12- ان تكون ملائمة للعمليات التصنيعية .

ان الصفات المذكورة اعلاه لا يمكن ان تجتمع في نوع واحد او سلالة واحدة لذلك قد يستعمل خليط من السلالات لاظهار الفعل الايجابي .

الفصل الثاني

بكتريا حامض اللاكتيك

ايض بكتريا حامض اللاكتيك

بكتريا حامض اللاكتيك

Lactic Acid Bacteria

تمثـل بكتريــا اللاكتيــك Lactic acid bacteria والبكتريــا المنــشطرة Bifidobacteria العناصـر المحوريـة والاكثـر اسـتعمالا كأحيـاء علاجيـة . وهـي مجموعـة متباينة من البكتريا موجبة لصبغة كرام وتشترك في كونها تنتج حامض اللاكتيك Lactic acid في الحليب أي أنها من الأحياء المحمضة للحليب Milk souring organisms .

وتعيش بكتريا حامض اللاكتيك في بيئـات غنيـة بـالمواد الغذائيـة ومـصادر الطاقـة لـذلك قلت قابليتها التخليقية للعديد من المواد ولكنها لازالت تحتوي على المعلومات الوراثية وان بدت ظاهريا فاقدة لها وذلك لان بعض عمليات التطفير يمكن ان تعيدها الى حالة التغذية الاولية Prototrophy لبعض الحوامض الامينية التـي تحتاجهـا الاحيـاء الطبيعيـة غير المطفرة . وبهذا الوضـع اصبحت بكتريا حامض اللاكتيك احياء عوز غذائي طبيعي Natural auxotrophs وهذا يعكس تـاثير عمليات التطور ونمط الانتخاب الذي يحصل عند العيش في بيئات غنية .

لذلك طورت هذه المجموعة العديد من القابليات لتنافس الاحياء الاخرى التي تكثر في البيئات الغنية التي تعد مثالية للعديد من الاحياء المجهرية ومن هذه القابليات :-

- انتاجهـا للحـوامض العضوية وبشكل رئـيس حـامض اللاكتيك مـن الكاربو هيـدرات وتحملهـا للحامض وربما كان هذا هو السبب وراء تسميتها بكتريـا حـامض اللاكتيك ، واستعملت لانتـاج حامض اللاكتيك على نطاق تجاري .
- ان عيـشها فـي اوسـاط غنيـة ادى الـى تطـور انظمـة نقل فعـال Active transport لنقل المـواد الـى داخـل الخلايـا ، إضـافة الـى اسـتفادتها مـن الأوسـاط الغنيـة لتطـوير عمليـات التخمـر المرافق Cofermentations لمـواد اخـرى غيـر الكاربوهيدرات وبـذلك تستطيع الحـصول على طاقة اضافية منها وزيادة مدى المواد الناتجة من التخمر . فضلا عن تلاؤمهـا مـع ظـروف مختلفة مثل التهوية .

ان وصفها بانها بكتريا حامض اللاكتيك قد لا يكون صحيحا الـى حد بعيد ، اذ انهـا يمكـن ان تنتج حوامض اخرى مثل حامض الخليك ، ومن جهة ثانية فان هناك عددا من الاحياء الاخرى تنتج حامض اللاكتيك .

تـستوطن بكتريـا حـامض اللاكتيـك الاغشية المخاطيـة لجسم الانـسان والحيـوان وتوجـد علـى سطوح النباتات وفي منتجات الالبـان . ويكـون مـن المستحسن دراسـة ايض Metabolism هذه

المجموعة وكذلك طرق تصنيفها والنواحي الوراثية لها ثم الخوض في قابليتها المتعددة كاحياء علاجية .

أيض بكتريا حامض اللاكتيك

بكتريا حامض اللاكتيك من الاحياء المجبرة على التخمر Obligate fermentative نظرا لغياب حلقة البروفيرين Prophyrin التي تشكل نواة السايتوكرومات Cytochromes التي تمثل بعض حلقات السلسلة التنفسية ولذلك فهي لا تستطيع الحصول على الطاقة بالفسفرة التأكسدية Oxidative phosphorylation . وعليه امتازت بتخميرها للكاربوهيدرات المرتبطة بعمليات الفسفرة بمواد الاساس Substrate level phosphorylation لانتاج ATP الذي يستعمل لاغراض التخليق الحيوي . وللبكتريا القابلية على تفكيك العديد من الكاربوهيدرات والمركبات القريبة منها . واهم نواتج التخمر هو حامض اللاكتيك الذي يمثل 50% من السكر المتخمر .

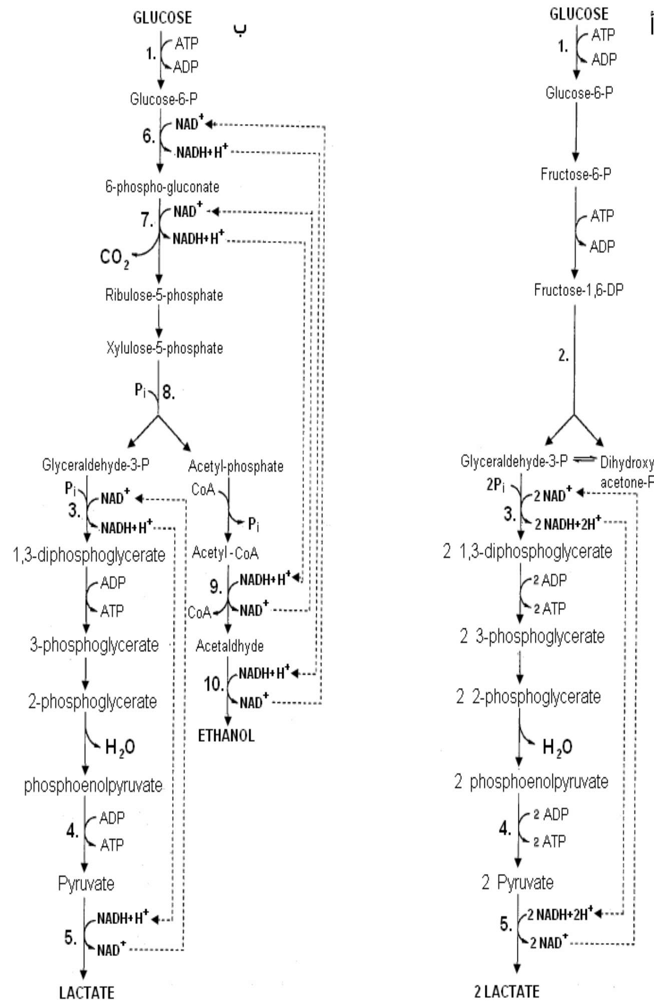
مسارات التخمر الرئيسة

تمتاز بكتريا حامض اللاكتيك في المسارات التي تسلكها لتخمر السكريات وأهمها :

تخمير السكريات السداسية Hexoses

تسلك بكتريا حامض اللاكتيك مسارين اساسية في تخمير السكريات السداسية مثل الكلوكوز . وهما التخمر المتجانس Homofermentation الذي ينتج حامض اللاكتيك بشكل رئيس ، والتخمر المتباين Heterofermentation الذي ينتج اضافة الى حامض اللاكتيك الكحول الاثيلي Ethanol ، والمخطط العام للمسارين موضح في الشكل (1)

يشترك المساران في الخطوات الاولى ، فعند دخول الكلوكوز الى الخلية يفسفر بانزيم الكاينيز المعتمد على ATP (ATP –dependent glucokinase) وبعض الأنواع تدخل الكلوكوز باستعمال نظام PTS Phosphoenolpyruvate – sugar - phosphotransferase system ويكون معطى الفوسفات (phosphoryl donor) هو مركب (PEP) Phosphoenolpyruvate . وفي الحالتين تكون الآصرة الفوسفاتية ذات الطاقة العالية لازمة لتنشيط السكر .



شكل 1 : تخمر السكريات السداسية أ: التخمر المتجانس ، ب: التخمر المتباين

1.glucokinase, 2.fructose-1,6-diphosphate aldolase, 3.glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase , 4.pyruvate kinase , 5. lactate dehydrogenase , 6.glucose-6-phosphate dehydrogenase, 7.6-phosphogluconate dehydrogenase , 8.phosphoketolase , 9.acetaldehyde dehydrogenase , 10. alcohol dehydrogenase .

التخمر المتجانس Homofermentation

يدخل السكر بعد الخطوات الاولى المشتركة دورة تحلل السكر Glycolysis او ما يسمى بمسار امبدن – مايرهوف Embden – Meyerhof pathway (EMP) وهو شائع في اغلب الخلايا مثل بكتريا اللاكتيك ما عدا جنس *Leuconostoc* وبعض العصيات اللبنية . ويتميز المسار بتكوين الفركتوز المفسفر Fructose -1.6- diphosphate (FDP) الذي ينشطر الى مركبين ثلاثية الكاربون هي Dihydroxy acetone phosphate (DHAP) و

(GAP) Glyceraldehyde - 3 phosphate ويتم تحويل المركبين الاخيرة الى بايروفات Pyruvate بعد سلسلة من التفاعلات التي تشارك فيها انزيمات عدة وتكون هذه التفاعلات مقرونة بتكوين جزئيتين من ATP بطريقة الفسفرة بمواد الاساس . وتحت الظروف الاعتيادية المتمثلة بوفرة السكريات وقلة الاوكسجين يتم تحويل او اختزال البايروفات الى حامض اللاكتيك بواسطة الانزيم (nLDH) NAD $^+$depended lactate dehydrogenase وبذلك يتم اعادة اكسدة NADH الذي تكون في المراحل المبكرة من عملية تحليل السكر . وبهذه الخطوات تتم المحافظة على حالة الاكسدة والاختزال Redox ويكون حامض اللاكتيك هو الناتج الرئيس .

التخمر المتباين Heterofermentation

وتمثل الطريق الاخر الذي اطلق عليه عدة تسميات منها مسار السكريات الخماسية المفسفرة Pentose phosphate pathway او Pentose phosphoketolase pathway ، او 6- phospho - gluconate / Phosphoketolase (6 -PG/PK) .

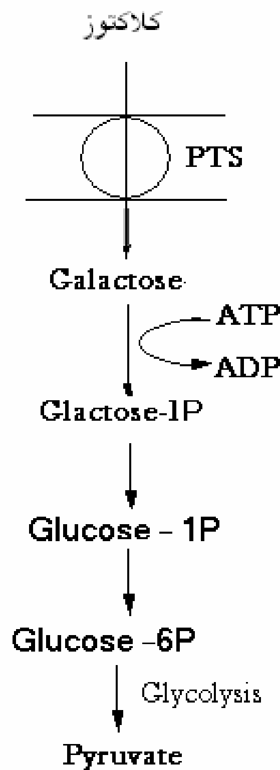
ويتميز المسار بخطوتين اولية تتضمن نزع جزيئة الهيدروجين (H_2) وتكوين Phospho – 6 – gluconate ثم تليها عملية ازالة ثنائي اوكسيد الكاربون (CO_2) ، وما يتبقى من Pentose - 5 -phosphate يتم شطره بانزيم Phosphoketolase الى كليسرالديهايد - 3 فوسفات (GAP) واستيل الفوسفات Acetyl phosphate . والمركب الاول يتم تحويله بخطوات مشابهة لما يحدث في التخمر المتجانس الى حامض اللاكتيك ، اما فوسفات الاستيل فعند عدم توفر مستلمات للالكترونات Electron acceptors فانها تختزل الى الكحول الاثيلي عن طريق Acetyl CoA والاستالديهايد ، وبذا تتكون نواتج اخرى اضافة الى حامض اللاكتيك ولذا سمي بالتخمر غير المتجانس او المتباين .

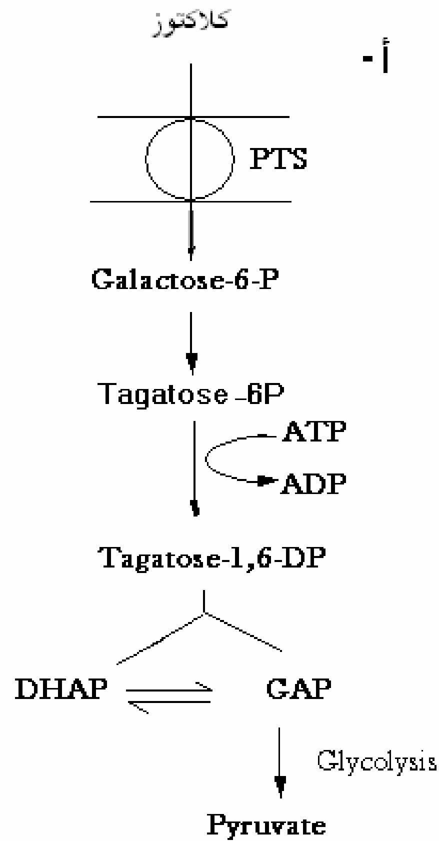
ينتج التخمر اللاكتيكي المتجانس نظريا 2 مول من حامض اللاكتيك من مول كلوكوز وصافي طاقة 2ATP ، في حين ان التخمر المتباين يؤدي الى انتاج مول واحد من حامض اللاكتيك والكحول الاثيلي وثنائي اوكسيد الكربون وجريئة واحدة من ATP . ولكن عمليا يلاحظ ان هذه النسبة منخفضة وذلك لان جزء من كاربون السكريات يدخل في بناء الكتلة الحيوية Biomass للخلايا بالرغم من توفر الاحتياجات الغذائية لها في أوساط النمو .

اما السكريات السداسية الاخرى مثل المانوز والكلاكتوز والفركتوز فهي يمكن ان تستهلك من قبل بكتريا حامض اللاكتيك ، فتدخل المسارات الايضية على شكل Glucose-6-phosphate او Fructose -6-phosphate بعد اجراء تغييرات في مواقع الكربون بواسطة الانزيمات . ونظرا لاهمية الكلاكتوز الذي يمثل احد شطري سكر الحليب فبعض البكتريات لا تستطيع استهلاكه وتفرزه الى الخارج اما بكتريات اخرى فهي تتعامل مع السكر بشكل خاص ومنها بكتريا *Lb.*

casei ، *Lactococcus lactis* ، *Enterococcus faecalis* فان تايض الكلاكتوز في الاحياء التي تستعمل PTS لقبط السكر (سواء كانت عصيات او مكورات) ، يكون باستعمال الكلاكتوز المفسفر Galactose -6p الناتج بتاثير PTS ويدخل الى مسار Tagatose-6p او Le Loir pathway الموضح في الشكل (2) .

وسكر التاكتوز هو نظير Stereoisomer للفركتوز ولكنه يحتاج الى انزيمات مختلفة لعمليات التحويل ، ويشابه طريق التاكتوز طريق GAP في مراحله الاولى من عملية تحلل السكر . وتوجد سلالات معينة تدخل الكلاكتوز عن طريق ناقلات خاصة Permeases والاستمرار في تغييره الى حين يدخل دورة تحلل السكر كما موضح في الشكل اعلاه ويسمى Le Loir pathway (شكل 2 : ب)





شكل 2 :ايض الكلاكتوز

تخمير السكريات الخماسية Pentose fermentation

تخمر بكتريا حامض اللاكتيك عددا من السكريات الخماسية وبصورة عامة هناك ناقل Permease خاص لكل سكر يدخل الى داخل الخلية . وداخل الخلية تتم فسفرة السكر ليتحول الى Xylose-5p او Ribulose-6p بواسطة انزيمات Epimerases او Isomerases ثم تسلك طريق التخمر المتباين الموضح في الشكل (1) وهذا يعني ان الاحياء متباينة التخمر هي التي تستهلك السكريات الخماسية . ولكن توجد العديد من الاحياء متجانسة التخمر تستطيع استهلاك السكريات الخماسية ما عدا مجموعة محدودة من العصيات اللبنية . ويكون الانزيم الرئيس في معظم الاحياء سواء متباينة التخمر او متجانسة التخمر هو Phosphoketolase من الانزيمات المستحثة Inducible ويستحث بالسكريات الخماسية .

وبشكل عام فان البكتريا اللبنية متباينة التخمر تنتج عددا من المنتجات من تخمر السكريات الخماسية تختلف عن تلك المنتجة من تخميرها للكلوكوز فهي لاتنتج ثنائي اوكسيد الكربون في هذه الحالة ، وعليه فان خطوة اختزال فوسفات الاستيل تكون منخفضة ، اذ تخضع فوسفات الاستيل لتاثير انزيم Acetate kinase لتعطي ATP بالفسفرة بمواد الاساس والخلات وهذا يؤدي الى اعطاء كميات متكافئة من حامض اللاكتيك والخليك .

اما الكلوكانات Gluconate فهي تخمر بشكل مشابه للسكريات الخماسية أي بطريق 6-PG/ PK معطية نواتج التخمر اللاكتيكي المتباين في انواع تعد متجانسة التخمر . ويتم نقل الكلوكونات بواسطة PTS Gluconate مستحث لينتج الشكل المفسفر لها 6-phosphogluconate لتدخل المسار 6-PG/ PK .

اما في الانواع متباينة التخمر تدخل الكلوكونات باستعمال Permease لان مجموعة متباينة التخمر ينقصها نظام النقل PTS ونظرا لان عملية ازالة الهدروجين Dehydrogenation تعد خطوة مهمة قبل الوصول الى reduction Phosphoketolase لذلك فان بعض فوسفات الاستيل يتم اختزالها الى الكحول الاثيلي للحفاظ على توازن الأكسدة والاختزال داخل البيئة الخلوية .

تخمرات السكريات الثنائية Disaccharide fermentations

وتشمل عددا من السكريات الثنائية ولعل أهمها بالنسبة لبكتريا حامض اللاكتيك هو اللاكتوز . وبصورة عامة تدخل السكريات الثنائية إلى الخلايا أما بشكل سكريات حرة أو تدخل بشكل سكريات مفسفرة اعتمادا على طريقة نقلها إلى الخلايا . والسكريات الحرة تنشطر داخل الخلية بتأثير إنزيمات التحلل المائي Hydrolases ثم تدخل المسارات المذكورة انفا .

أما السكريات التي تدخل مفسفرة وعندما يكون ذلك عن طريق PTS ففي داخل الخلية تنشطر بتأثير إنزيمات التحلل المائي Phosphohydrolases لتتحول إلى سكر أحادي حر وسكر أحادي مفسفر .

تخمر اللاكتوز

يعد من أهم السكريات التي درس تخميرها في بكتريا حامض اللاكتيك خاصة في *Lc . lactis* وتنقله الخلايا بنظام PTS خاص به ، ويدخل الخلايا بشكل مفسفر ، وداخل السايتوبلازم يتم شطره بواسطة β-D-galactosidase(β-gal) ليعطي جزيئة الكلوكوز المفسفرة عند الذرة السادسة . فالكلوكوز تتم فسفرته بانزيم Glucokinase ويتم تايضه بطريقة تحلل السكر Glycolysis اما الشطر المفسفر الاخر فيتم تايضه عن طريق Tagatose -6-p الموضح في الشكل (2) .

ويلاحظ ان كل من Lactose PTS وP-β-galactosidase هي في الإنزيمات المستحثة والتي تكبح (Repressed) بالكلوكوز .

اما بقية البكتريا فتنقل اللاكتوز عن طريق Permease وينشطر فيما بعد بأنزيم β -gal ، وكل من نظام PTS ونظام Permease يمكن ان يوجدا سوية في بعض سلالات بكتريا حامض اللاكتيك. وهناك بعض البكتريا المحبة للحرارة (Thermopiles) مثل *S. thermophilus* و *Lb. delbrueckii* ssp *delbrueckii* و *Lb. delbrueckii* ssp *lactis* و*Lb. acidophilus* تخمر الكلوكوز بعد نقل اللاكتوز وشطره بـ β – gal ويفرز الكلاكتوز الى الوسط وقد اعزي هذا الى قلة فعالية الانزيم Galactokinase .

تخمر المالتوز

تختلف البكتريا في استهلاك السكر ، ففي بعضها يتم شطره بأنزيم Maltose phosphorylase الى كلوكوز حر وكلوكوز مفسفر عند الذرة الأولى β-glucose -1p ويستخدم الكلوكوز الحر في الفعاليات الحيوية لها ، اما الاخر الحاوي على الفوسفات فيعتقد انه يستخدم في تخليق مكونات الجدار الخلوي .

تخمر السكروز

يتم استهلاك السكر بمساعدة Permease system . وبداية يتم شطر السكروز بواسطة انزيم Sucrose hydrolase لينتج الكلوكوز والفركتوز التي تدخل المسارات الرئيسة ، وفي بعض المكورات اللبنية Lactococci يتم نقل السكروز بواسطة Sucrose PTS وعندها ينشطر بانزيم خاص Sucrose -6-P hydrolase الى فركتوز و Glucose – 6- P والإنزيمات المذكورة هي انزيمات مستحثة حيث تستحث بواسطة السكروز .

والسكروز يمكن ان يعمل معطيا للسكريات الأحادية لتكوين السكريات المكوثرة الخارجية Exopolysaccharides في بعض بكتريا حامض اللاكتيك ، ففي بكتريا *Leuconostoc mesenteroides* ينشطر السكروز بانزيم مرتبط بالجدار الخلوي وهو Dextransucrase ويستخدم الكلوكوز الناتج في انتاج الدكستران ، والفركتوز يخمر بالطرق العادية .

اما بقية السكريات الثنائية مثل Cellobiose وMelibiose وTrehalose فتتعامل معها مجموعة بكتريا حامض اللاكتيك بطرق مختلفة ، وبصورة عامة تنقل بأنظمة نقل خاصة بها وتحلل بإنزيمات التحلل المائي الخاصة بها مؤدية الى انتاج السكريات الاحادية او السكريات الاحادية المفسفرة التي تدخل المسارات العامة .

استعمال البايروفات

مما ذكر اعلاه يتضح ان البايروفات تمثل مركب وسطي مهم جدا ومن جهة ثانية فان بكتريا حامض اللاكتيك يمكن ان تغير من طرق تايض السكريات اعتمادا على الظروف المحيطة ، واكثر هذه التغيرات تطول البايروفات ، وكذلك تغير مستلمات الالكترونات الخارجية .

فالأساس في عمليات الايض هو اكسدة مواد الاساس للحصول على مركبات وسطية عالية الطاقة التي تستعمل لاحقا لانتاج ATP بطريقة الفسفرة بمواد الاساس وعليه فان عملية الاكسدة تؤدي الى انتاج NADH من NAD^+ الذي لا بد من الحصول عليه لغرض استمرار عمليات التخمر وحياة الخلية .

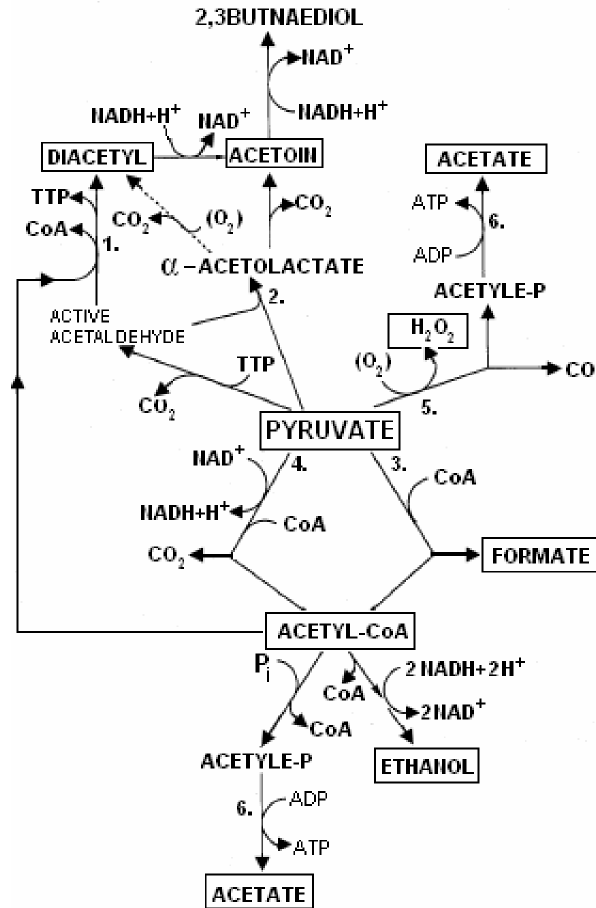
ويلاحظ ان البايروفات هي المركب الوسطي الأساسي المهم Key intermediate اذ تعمل مستقبل للالكترونات (او الهدروجين) لغرض الحصول على NAD^+ ، وهذا يلاحظ تحت الظروف الطبيعية (وهي وفرة من السكريات وقلة الاوكسجين) وانتاج حامض اللاكتيك . ولكن تحت ظروف خاصة لا تستخدم البكتريا البايروفات لانتاج الحامض وانما تستعمل مسارات اخرى كما في الشكل (3)

والمسارات الموضحة يمكن ان تسلكها الخلايا حتى تحت الظروف الطبيعية عند الحاجة للمواد في العمليات البنائية Anabolism . ومن الشكل يتضح ان النوع الواحد او السلالة الواحدة لا يمكن ان تقوم بكل المسارات وذلك لان المسارات تعتمد على السلالة والظروف المطبقة والقابلية الإنزيمية ، ومن المسارات المهمة :

1- مسار ثنائي الاستيل – الأسيتيون Diacetyl - Acetion pathway وهو المسار المؤدي الى انتاج ثنائي الاستيل(الذي يمثل مركب النكهة في الزبد) والاسيتيون ، وهو مسار عام في بكتريا حامض اللاكتيك ومهم في العمليات التصنيعية لمنتجات الألبان .

ويمكن ان تسلك البكتريا هذا المسار عند وجود فائض من البايروفات وعدم الحاجة لاستعادة NAD^+ . وهناك طريقان لانتاج ثنائي الاستيل وهي :

- تكوين α- acetolactate التي تنفلق بدون تأثير إنزيمي لتعطي ثنائي الاستيل وثنائي اوكسيد الكاربون .
- أو ينتج بواسطة Acetyl CoA



شكل 3 : مسارات استخدام البايروفات

1. Diacetyl synthetase ; 2. Acetolactate synthtase ; 3. Pyruvate format lyase ; 4. Pyruvate dehydrogenase ; 5.Pyruvate oxidase ; 6. Acetate kinase .

ووجد ان الاسيتيون يتكون بكميات كبيرة ولكنه لا يشارك في إعطاء النكهة للمنتجات .

ان وفرة البايروفات يمكن ان تحصل :

- o عند تفعيل المسارات البديلة لتكوين البايروفات غير تلك الموجودة اثناء تخمرات الكاربوهيدرات التقليدية .

o وجود مركبات تعمل مستقبلات للالكترونات للتعويض عن قلة البايروفات الناتجة من تخمر الكاربوهيدرات .

ففي الحالة الأولى يمكن ان تنتج البايروفات من تفكك السترات Citrate التي توجد في الحليب بكميات كبيرة تصل الى حوالي 1.5 ملغم / لتر ، وفي هذه الحالة تنفلق السترات بواسطة Citrate lyase إلى خلات و Oxaloacetate وتتم ازالة ثنائي اوكسيد الكاربون بتأثير الانزيم Oxaloacetate decarboxylase .

ومن الاحياء المستعملة لانتاج ثنائي الاستيل في منتجات الالبان *Lc. lactis* ssp *lactis* (biovar *diacetylactis*) والبكتريا *Leuconostoc mesenteroides* ssp *cremoris* . وتختلف البكتريات في نمط المسارات الخاصة والرقم الهيدروجيني (pH) الأمثل للانزيمات المستعملة في تحولات السترات ، ولكن في العموم تكون الظروف الافضل لانتاج ثنائي الاستيل هو قلة السكريات وانخفاض والرقم الهيدروجيني .

2- مسار البايروفات – الفورمات Pyruvate – format lyase system

وهو احد المسارات التي تدخلها البايروفات تحت الظروف اللاهوائية نظرا لحساسية الانزيمات العاملة في المسار للاوكسجين . ويقوم المعقد الانزيمي Pyruvate – format lyase بتحويل البايروفات و CoA الى فورمات و Acetyl CoA . والمركب الاخير يمكن ان يعمل مستقبلا للالكترونات مؤديا الى تكوين الكحول الاثيلي ، او يعمل كبداية لعملية الفسفرة بمواد الاساس عبر فوسفات الاستيل ، او يقوم بالاثنين معا . وقد وجد ان هذا النظام فعالا في العديد من بكتريا حامض اللاكتيك ومنها *Lb. casei* و *Lc. lactis* عند النمو تحت الظروف اللاهوائية وقلة مواد الاساس مؤديا الى تغيير نمط تخمرها المتجانس الى تخمر متباين وبذلك تكون نواتج التخمر متمثلة باللاكتات والخلات والفورمات والكحول الاثيلي والتي تكون عادة مرافقة لانخفاض معدلات نمو هذه الاحياء . ويمكن ان يوجد المسار في بعض الخلايا النامية على الكلاكتوز والمالتوز .

ان التحول من التخمر المتجانس الى التخمر المتباين يعد من التغيرات الفسلجية المهمة . ويحدث هذا التغيير نتيجة لانخفاض معدلات تحلل السكر Glycolysis والذي بدوره يؤدي الى انخفاض مستوى المركبات الوسطية نتيجة انخفاض الفعاليات الانزيمية. فمثلا في البكتريات *Lc. lactis* و *Lb.casei* فأنزيمات نزع هيدروجين اللاكتات nLDHs تكون من النوع الالوستيرية Allosteric ، ومن جهة ثانية فأن الانتقال من Triose phosphate (شكل 1) والتي تعرف بمثبطات مسار البايروفات – الفورمات تكون مستوياتها اقل في حالة الخلايا متباينة التخمر ، لذلك فانه في حالة قلة المواد الكاربوهيدراتية او ما يسمى بشبه الصيام

Starvation فأن الخلايا تنظم فعالياتها بحيث تمنع جزئيا اختزال البايروفات الى لاكتات وتلجأ للحصول على الطاقة من مسار البايروفات – الفورمات. وتشير الدراسات الى ان نمط التخمر المتباين يعطي معدلات نمو عالية مما يشير الى زيادة كمية ATP الناتجة من الكلوكوز .

3- مسار تأثير الاوكسجين على البايروفات

للاوكسجين تاثير كبير على ايض البايروفات في بكتريا حامض اللاكتيك كما موضح في الشكل اعلاه (شكل 3) ، فتاثيره يكون مباشرا او غير مباشرا ، ففي حالة التاثير غير المباشر يكون التأثير على الإنزيمات $NADH-H_2O_2$ oxidase و$NADH-H_2O$ oxidase . فالانزيم Pyruvate oxidase يحول البايروفات الى ثنائي اوكسيد الكاربون وفوسفات الاستيل وتكوين بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 ويعتقد انه يعمل في الايض الهوائي للبكتريا *Lb. plantarum* التي تكون كميات كبيرة من حامض الخليك تحت الظروف الهوائية ، وتزداد كمية الانزيم وفعاليته في الخلايا النامية على اللاكتوز وليس الكلوكوز ، كما ان الانزيم يخضع لعمليات التنظيم بالمركبات الوسطية لعملية تحلل السكر Glycolysis .

4 - مسار ازالة الهيدروجين من البايروفات :

يكون انزيم نزع الهيدروجين Pyruvate dehydrogenase في المكورات اللبنية انزيم معقد ، ينتج من تفاعله Acetyl CoA وبذلك فهو يشابه Pyruvate – formate lyase ، أي ان له دورا اساسيا في انتاج Acetyl CoA اللازم لتخليق الدهون تحت الظروف الهوائية . اما تحت الظروف اللاهوائية فان هذا الدور (تخليق الدهون) المحتمل يقوم به النظام Pyruvate – format lyase ، فعليه فان تعريض الخلايا للهواء يؤدي الى تفعيل انزيم نزع هيدروجين البايروفات لإنتاج Acetyl CoA نظرا لان النظام الاخر Pyruvate – format lyase يثبط بالأوكسجين . اضافة الى ذلك فان انزيم نزع هيدروجين البايروفات يشارك في عمليات الهدرجة تحت الظروف الهوائية .

نظائر حامض اللاكتيك

عند تخمير السكريات من قبل بكتريا حامض اللاكتيك يمكن ان تنتج النظير اليساري الدوران L-lactic acid او النظير اليميني الدوران D-lactic acid او تنتج كميات متكافئة او غير متكافئة من النظيرين ، وذلك يعتمد على خاصية الانزيم NAD^+-dependent lactate dehydrogenase (nLDH) وهذا يعني ان البكتريا اما تحتوي على L-nLDH او D-nLDH ولكن بعض الانواع تحتوي على الانزيم الذي يحول النوع اليساري L الى النظير اليميني D وهذا يعني ان المنتج الاول هو اليساري وهو الذي يقوم بحث انزيم

Racemase مؤديا الى انتاج خليط من النظيرين ولذلك يلاحظ ان النوع السائد في بداية النمو هو اليساري في حين يزداد النظير اليميني في طور الاستقرار Stationary phase من اطوار النمو .

ويعتقد ان الرقم الهيدروجيني وتركيز البايروفات داخل الخلية يؤثر على فعاليات إنزيمات نزع هيدروجين اللاكتات LDHs مما يؤدي الى اختلاف نسب النظيرين إثناء النمو .

(اما فيما يخص البروتينات والتعامل معها يراجع الفصل الرابع / البيبتيدات الفعالة) .

تحولات الطاقة الحيوية Bioenergetics

تشمل التحولات بعض المركبات وأهمها ATP والقوة الدافعة للبروتون Proton motive force(pmf) ومكوناتها من الرقم الهيدروجيني الداخلي والخارجي وكذلك فرق الجهد الكهربائي (Ψ) على جانبي الأغشية الخلوية. وتداخل وتفاعلات هذه المكونات يهدف الى تخليق ATP الذي يعد العملة الأساسية والمتداولة للطاقة في الأنظمة الحيوية ، ويكون ملائما لعمليات البناء الخلوي والتي تتمثل ببناء الجزئيات الحيوية الكبيرة وكذلك يساهم في نقل المواد الى داخل الخلية عكس التركيز أي النقل الفعال Active transport .

ان الطريق العام لتحولات الطاقة في الخلايا الحية يمكن تفسيرها بالاعتماد على نظرية الضخ الكيماوي Chemiosmotic theory التي وصفت من قبل Mitchell في بداية ستينات القرن المنصرم وهي المقبولة لحد الان في تفسير تحولات الطاقة الحيوية .

وفيها تؤدي العمليات الحيوية الى خلق تدرج في البروتونات Proton gradient عبر الأغشية الخلوية شبه الناضحة Semi permeable ومن اهم المكونات التي تساعد على ذلك السلاسل التنفسية . وضخ البروتونات الى الخارج يؤدي الى فرق في الرقم الهيدروجيني على جانبي الغشاء الخلوي الذي يكون قاعديا داخل الخلية ، اضافة الى ذلك فأن ضخ البروتونات(H^+) الى خارج الخلية يؤدي الى خلق فرق جهد كهربائي ($\Psi\Delta$) على جانبي الغشاء أذ يكون سالبا داخل الخلية . ومجموع الفرق في الرقم الهيدروجيني والجهد الكهربائي يؤدي الى إيجاد قوة تدفع البروتونات الى داخل الخلية والتي أطلق عليها قوة البروتون الدافعة Proton motive force (pmf) وهذه القوة في الاحياء التي تقوم بعمليات التنفس والأكسدة تكون كبيرة وتستخدم في تخليق ATP التي تتم بواسطة النظام H^+- translocating ATPase المرتبط بالاغشية ويطلق عليه ايضا ATP synthetase نظرا لوظيفته لتخليق ATP ، وبذلك فأن الطاقة الناتجة من دخول البروتونات الى الخلية يمكن ان تقوم بتخليق ATP من ADP والفوسفات غيرالعضوية ، وتسمى العملية بالفسفرة التأكسدية .

اما في بكتريا حامض اللاكتيك والتي لا تمتلك سلاسل تنفسية نظرا لعدم وجود حلقة البروفيرين كما ذكر في مستهل الموضوع فهي غير قادرة على استعمال هذه الطريقة من الفسفرة وهي الفسفرة التأكسدية ولكن تكون ATP عن طريق الفسفرة بمواد الأساس التي تميز عمليات التخمر . اضافة الى ذلك فان بعض هذه البكتريا تمتلك انزيم مشابه للـ ATP synthetase المذكور اعلاه ولكن تفاعله يكون معكوسا ، أي انه يقوم بتحليل ATP الذي يكون مرافقا لضخ البروتونات الى خارج الخلية وبذلك تحصل الخلايا على القوة الدافعة للبروتونات لتساعد في الفعاليات التي تحتاج الى الطاقة مثل نقل المواد الغذائية والايونات عكس التركيز ، وعليه فأن الاختلاف بين فعالية الانزيمات يعكس بشكل اساسي الاختلاف في نمط عمليات الايض .

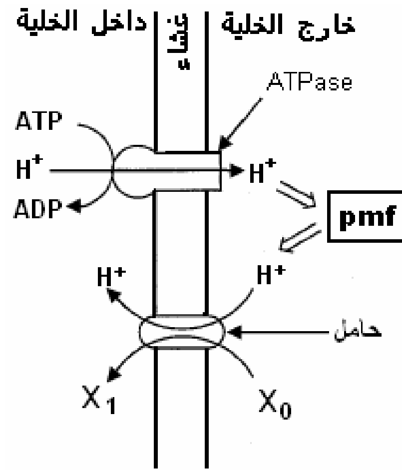
وبالاعتماد على نظرية Mitchell في الضخ الكيماوي وكون الغشاء محدود النضوحية خاصة للبروتونات والجزيئات الاخرى المشحونة مثل الحوامض العضوية الضعيفة المتأنية عند نقطة قريبة من التعادل لذلك يطرد حامض اللاكتيك المتكون الى خارج الخلية . وعندما يكون الرقم الهيدروجيني واطئا يكون جزء من الحوامض العضوية غير مفكك وهو الذي يبدو انه يوقف عملية التخمر . وذلك لان الجزء غير المفكك يكون غير مشحون ومحب للدهون Lipophilic ويعبر الأغشية الخلوية ويدخل الى الخلايا وعندها يكون الرقم الهيدروجيني اعلى من الخارج لذا يتفكك الى ايونات وبروتونات ، وللحفاظ على التعادل داخل الخلية يتحلل ATP بواسطة Proton translocating ATPase – لغرض طرد البروتونات الى الخارج وعندها يحصل نقص في ATP اللازم للفعاليات الخلوية الاخرى لذلك لا يمكن الحفاظ على عيوشية الخلايا Viability ، كما ان الخلايا تقتل بتثبيط بعض الإنزيمات الخلوية والتاثير على المركبات الاساسية فيها .

والحالة اعلاه تحدث عندما يكون هناك تسارع في دخول الحوامض وعدم تزامنه مع ضخ البروتونات الى الخارج والذي يؤدي الى خفض الرقم الهيدروجيني داخل الخلايا وتحدث الحالة بدرجات حرارية مرتفعة نوعا ما مثل حرارة 25 ْم اكثر وتقل عند درجة 4 ْم لذا تبقى الخلايا لمدة أطول .

والبكتريات بصورة عامة تحاول الحفاظ على الرقم الهيدروجيني الداخلي عند مدى معين ولكن بكتريا حامض اللاكتيك تختلف عنها في ان داخلها متطبع على الانخفاض في الرقم الهيدروجيني وان كانت هناك بعض الاختلافات فيما بينها . فالعصيات اللبنية اكثر تحملا للرقم الهيدروجيني المنخفض مقارنة بالأجناس الأخرى ، فمثلا العصيات اللبنية يمكن لأنزيماتها ومادتها الخلوية العمل برقم هيدروجيني 4.2 - 4.4 في حين ان المكورات اللبنية لا تعمل أنزيماتها برقم يقل عن 5 . وبما ان الرقم الهيدروجيني الخارجي (أي في الوسط المحيط) ينخفض تحت هذه القيم نتيجة لتكون الحوامض لذلك وجب وجود آليات للحفاظ على الرقم الهيدروجيني الداخلي ، وقد

وجد ان H^+ ATPase يلعب دورا مهما في هذه المهمة فهو يقوم بدفع البروتونات H^+ الى خارج الخلية وإدخال ايونات الكالسيوم K^+ للحفاظ على السايتوبلازم بقلوية اكبر من خارج الخلية ، وعليه فأن تخليق وفعالية H^+ - ATPase تكون تحت سيطرة قيم الرقم الهيدروجيني الداخلي .

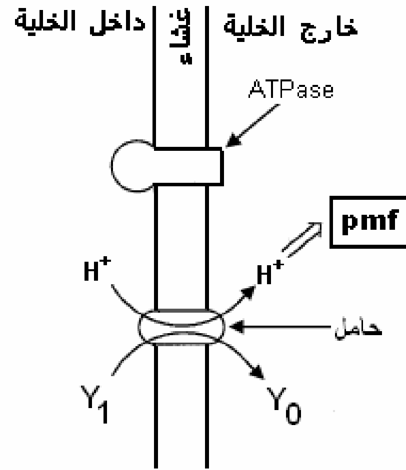
وللحفاظ على الرقم الهيدروجيني الداخلي عند الحد الحرج وكذلك توليد القوة الدافعة للبروتونات تحتاج الخلايا الى توفير كميات من ATP الناتجة من الفسفرة بمواد الاساس وهذا يعني شحة في كميات ATP المتوفرة لعمليات التخليق والبناء الخلوي ولذلك طورت بكتريا حامض اللاكتيك آليات للتعويض عن ATP المسحوب في العمليات أعلاه ، فهي تستعمل القوة الدافعة للبروتونات لنقل المواد الى داخل الخلية كما موضح في الشكل (4)



شكل 4 : استعمال pmf لنقل المواد الى داخل الخلية

فإدخال البروتونات الى داخل الخلية يمثل القوة الدافعة لإدخال المواد التي تدخل مع البروتون ويطلق عليها عملية النقل المتناسق Proton symport وقد تكون العملية عكسية عند إخراج المواد كما موضح في الشكل (5)

فمثلا المواد التي تخرج الى خارج الخلية هي نواتج التخمر مثل اللاكتات وعند إخراجها ستؤدي الى خلق قوة دافعة للبروتونات وهذا ما يطلق عليه بتدوير الطاقة او عودة دورة الطاقة Energy recycling فعند طرح المواد يؤدي الى تكوين عدم توازن في الكهربائية (Electrogenic) وهذا يؤدي بدوره الى توليد القوة الدافعة للبروتونات ، وقد وجد ان طرح جريئة واحدة من اللاكتات يؤدي الى اخراج بروتون واحد . كما وجد في بعض المكورات اللبنية ان توليد فرق الجهد الكهربائي اللازم على جانبي الغشاء الخلوي يحدث عند أرقام هيدروجينية حوالي 6.3 عندما يكون تركيز اللاكتات خارج الخلية حوالي 10 ملي مول .



شكل 5 :النقل المتناسق لنقل المواد

اما عند انخفاض الرقم الهيدروجيني الخارجي وارتفاع تركيز اللاكتات فأن دفقها الى الخارج يكون متعادل كهربائيا ولا يؤدي الى توليد القوة الدافعة للبروتونات . وعمليا تكون هذه العملية هي التي تحافظ على الطاقة الفعالة في المراحل الاولى من النمو وبذلك تفيد بكتريا حامض اللاكتيك في التنافس مع الاحياء الاخرى . وقد وجد ان تنمية بكتريا حامض اللاكتيك مع احياء تستهلك اللاكتات مثل *Pseudomonas stutzeri* التي تجعل تركيز اللاكتات خارج الخلية منخفضا والرقم الهيدروجيني مرتفعا مما يؤدي الى زيادة معدل النمو لبكتريا حامض اللاكتيك .

وقد وجد ان عملية تدوير الطاقة فعالة ايضا بالنسبة للخلات كما في البكتريا *Lb. plantarum* والتي تنتج الخلات بدلا من اللاكتات عند تغير الظروف من اللاهوائية الى الهوائية مؤديا الى زيادة حاصل النمو من الكلوكوز المستعمل .

وعلى العموم فأن تدوير الطاقة المعتمد على دفق او اخراج اللاكتات الى الخارج لا يوجد في جميع بكتريا حامض اللاكتيك وانما هناك انواع طورت آليات اخرى لتستعملها .

الأوكسجين كمستلم للالكترونات

يكون الأوكسجين المستلم النهائي للالكترونات Terminal electron acceptor (TEA) في الأغلبية العظمى من الاحياء الهوائية ، وتكون نتيجة أكسدة المواد الغذائية المعطية للالكترونات (أو الهيدروجين) هو تكون الماء .

وفي بكتريا حامض اللاكتيك يكون مستلم الالكترونات هو الأوكسجين لتفاعلات NADH-oxidases ، والانزيم الاخير واسع الانتشار في هذه المجموعة من البكتريا ، وعادة يستحث بواسطة الأوكسجين ونتيجة التفاعلات هي $NAD^+ + H_2O$ أو $NAD^+ + H_2O_2$ اعتمادا على التفاعل فيما اذا كان يتوسط نقل زوج من الالكترونات أو اربعة الكترونات .

واغلب بكتريا حامض اللاكتيك تحوي الانزيم NADH-peroxidase الذي يستعمل بيروكسيد الهيدروجين (H_2O_2) كمستلم لالكترونات ليكون الماء والذي ربما طغت فعاليته على تفاعل O_2 + NADH-H_2 . ويمكن ان يتنافس انزيم NADH-oxidase مع nLDH (الإنزيمات النازعة للهيدروجين) في البكتريا متجانسة التخمر ويؤدي الى حالة مشابهه لتفكيك السترات أي وفرة من البايروفات لتدخل مسار ثنائي الاسيتل – والاسيتون (المار الذكر) ، لذلك تكون هناك وفرة من الاسيتون في المزارع المعرضة للتهوية مقارنة بالمزارع بدون تهوية كما في البكتريا *Lc. lactis* والعصيات اللبنية متجانسة التخمر ومجموعة Carnobacteria .

ومن الملاحظ ان مجموعة البكتريا متباينة التخمر لا تستجيب للاوكسجين مثل مجموعة المتجانسة التخمر وذلك قد يكون نتيجة عدم منافسة الانزيم NADH-oxidase للأنزيم nLDH ولكنه يتنافس مع انزيم نزع هيدروجين الاستالديهايد Acetaldehyde dehydrogenase وانزيم نزع هيدروجين الكحول Alcohol dehydrogenase الخاص بمسار تكوين الكحول الاثيلي وبذلك فان البايروفات لا تنتج بكثرة ويبقى حامض اللاكتيك هو الحامض الرئيس المنتج .

ان معدلات النمو تزداد بالتهوية المعتدلة وذلك يمكن ان يعزى الى كون NADH oxidase فعالا ويمنع تكوين الكحول الاثيلي وبدلا عنه تتكون فوسفات الخلات ويمكن الحصول على زيادة من ATP من تفاعلات الانزيم Acetate kinase مؤديا الى حصول زيادة في الحاصل من الكلوكوز Y_{glu}. اما الطفرات التي ينقصها NADH oxidase فلا يحصل زيادة في حاصل النمو من الكلوكوز ويبقى معدل نموها بالمستوى نفسه تحت الظروف الهوائية واللاهوائية . ان غلق مسار تكون الكحول في مسار 6-PG/PK بوجود الأوكسجين يكون شائعا في البكتريا متجانسة التخمر .

ومن الملاحظات الاخرى ان للأوكسجين دورا فعالا كمستلم للالكترونات في ايض بكتريا حامض اللاكتيك لبعض المواد التي لا يتم تخمرها الا بوجود الأوكسجين ومن هذه المواد هي المواد المختزلة مثل الكحولات المتعددة Polyols مثل الكليسرول والمانيتول . ومن الملاحظات الاخرى ان بعض سلالات *Lb. brevis* لاتستطيع تخمير الكلوكوز لاهوائيا وانما يتم ذلك تحت الظروف الهوائية فقط وذلك لعدم وجود تفرع مسار الكحول الاثيلي في مسار 6-PG/PK وبشكل خاص انعدام انزيمِ Acetaldehyde dehydrogenase وهذا النقص حتم الحاجة لمستقبل الكترونات خارجي مثل الأوكسجين عند تخمير الكلوكوز . والأوكسجين يكون مساعدا في تخمر اللاكتات الناتجة الى خلات وثنائي اوكسيد الكاربون في بعض البكتريات كما انه يكون ضروريا في تخمير اللاكتات في البعض الاخر كما في البكتريا *Lb. plantarum* أذ تنتج

جزيئة من ATP لكل جزيئة لاكتات بنظام يشمل عدة مكونات منها انزيم نزع هيدرروجين اللاكتات المعتمد على NAD او غير المعتمد NAD^+- dependent lactate dehydrogenase و NAD^+- independent lactate dehydrogenase وانزيم Pyruvate oxidase وانزيم Acetate kinase .

وعند وجود Hematin أو الهيموغلبين في الوسط الغذائي فأن بعض بكتريا حامض اللاكتيك وخاصة المكورات المعوية فأنها يمكن ان تغير نمط ايضها من التخمري الى النمط التنفسي ، أي تكون الكاتيلز الحقيقي True catalase والسايتوكرومات وتستعمل الاوكسجين كمستلم نهائي للالكترونات والذي بدوره يؤدي الى زيادة انتاج ATP المتكون بطريق الفسفرة التأكسدية ، ولذلك فان هذه المجموعة يفترض انها قادرة على تكوين التركيب الرئيس Apoenzyme للسايتوكرومات والكاتليز ولكنها غير قادرة على تكوين البروفيرين الذي يعوض بوجود المركبات المذكورة أعلاه .

ومن جهة ثانية يلاحظ ان ليست جميع بكتريا حامض اللاكتيك قادرة على حماية نفسها من التأثير السام للاوكسجين كما هو الحال مع الاحياء الهوائية ، فالمجموعة خالية من الكاتيلز بالرغم من ان البيروكسيد يمكن ان يحلل بالكاتيلز الكاذب Pseudocatalase في بعض السلالات ، الا ان تكون البيروكسيد بواسطة NADH oxidase يمكن ان يزداد الى تراكيز عالية قاتلة .

والانزيم الاخر العامل في مواجهة تاثير الاوكسجين هو انزيم Superoxide dismutase (SOD) وهو يوجد في بعض المكورات المعوية واللبنية وتكاد تخلو منه العصيات اللبنية . كما ان فعاليته في الاحياء الحاوية عليه تعتمد على وجود تراكيز عالية من ايون Mn^{++} ، فعند وجود الاخير بتراكيز 30- 35 ملي مول يمكن ان يكتسح أي ايون من O_2^- ، وبشكل عام فأن الانزيم ينتشر في البكتريات ذات العلاقة بالمواد النباتية التي تكون غنية بأيون المنغنيز مثل Leuconostocs و Pediococci .

مستلمات الالكترونات الاخرى

لا يقتصر استعمال بكتريا حامض اللاكتيك للاوكسجين مستلما نهائيا للالكترونات ، فعند الظروف اللاهوائية هناك عددا من المواد العضوية التي يمكن ان تستعمل مستلمات للالكترونات حتى تحت ظروف تخمر الكلوكوز العادية وذلك لان الوضع يزيد من كميات ATP المنتجة لكل جريئة كلوكوز مستهلكة . فاللاعب الرئيس في هذه التحولات هو فوسفات الاستيل كمركب وسطي ودوره يعتمد على وجود او غياب مستلم الالكترونات النهائي الخارجي ، فيمكن ان يسير المسار لانتاج الكحول الاثيلي وعندها لا تنتج أي من ATP ، او انتاج الخلات وعندها تنتج جريئة واحدة من . ATP وقد اقترح ان المسار الفرعي لإنتاج الكحول الاثيلي هو طريق تعويضي للسماح بالنمو عند

غياب مستلم للالكترونات النهائي الخارجي .وفي بعض السلالات يكون هذا المسار الفرعي مفقودا لذلك تحتاج الى مستلم الكترونات نهائي عند تخميرها للكلوكوز .

وعند مقارنة المنتجات النهائية لتخمرات البكتريا متباينة التخمر بوجود او غياب مستلم للالكترونات نهائي ، يلاحظ ان النتائج تكون غير متماثلة مع مجموعة البكتريا متجانسة التخمر ، فعند وجود المستلم فان التخمر المتجانس وتحت الظروف الاعتيادية ينتج الأسيتون نتيجة لزيادة البايروفات ، اما تحت الظروف اللاهوائية فأن بعض مستلمات الالكترونات العضوية تلعب دورا اساسيا ومن المواد التي تستعمل الاستالديهايد و α- ketoacids والسترات والفركتوز والفيوميرات Fumarate والكليسرول .

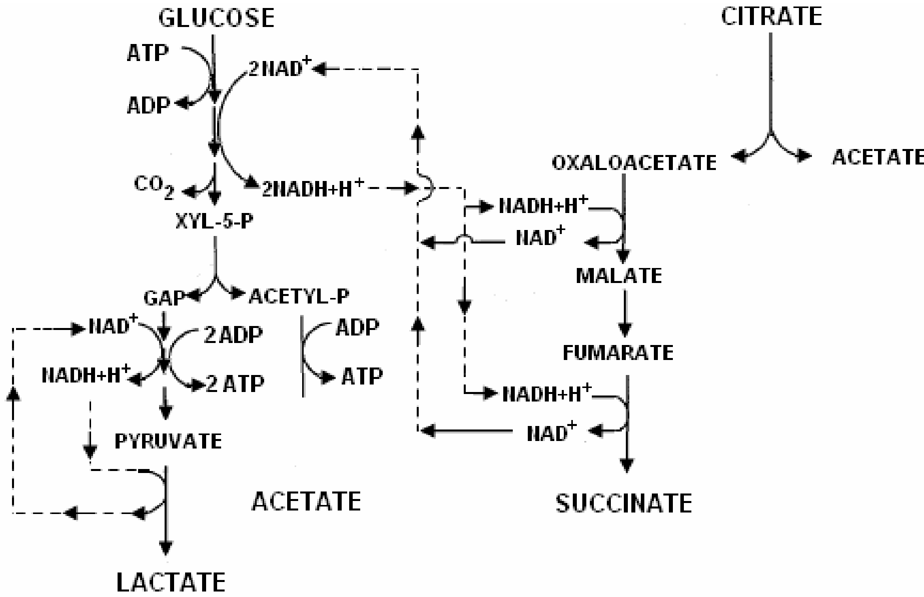
السترات Citrate

من المواد المهمة في تفاعلات بكتريا حامض اللاكتيك من الناحية الفسلجية وكذلك التصنيعية . وتستعمل كمستقبل للالكترونات بشكل غير مباشر وتكون طليعة لمركب اخر وعندما تتأيض :

الخطوة الاولى هي شطر السترات بانزيم Citrate lyase لتكوين الخلات و Oxaloacetate ، وازالة ثنائي اوكسيد الكاربون من المركب الاخير الحاوي على اربعة ذرات كاربون لينتج عنه البايروفات التي تستعمل في مسار ثنائي الاستيل - الاسيتون .

وبعض البكتريا متباينة التخمر تقوم بتمثيل Assimilation السترات بشكل مرافق لتخميرها الكاربوهيدرات وفي هذه الحالة لا تنتج كميات كبيرة من ثنائي الاستيل والاسيتيون . والبايروفات الفائضة تختزل الى حامض اللاكتيك وهذا يمنع فوسفات الاستيل من الذهاب الى انتاج الكحول الاثيلي وانما تتكون كميات من ATP من فعالية الاختزال بواسطة انزيم كاينيز الخلات Acetate kinase مما يؤدي الى زيادة كفاءة استخدام الكلوكوز وزيادة معدل النمو .

وعلى العموم فأن بكتريا حامض اللاكتيك يمكن ان تستخدم نواتج شطر السترات بطرق اخرى . أذ ان البكتريا يمكن توجه Oxaloacetate لانتاج حامض السكسينيك Succinic acid كما في البكتريا *Lb. plantarum* التي تحتاج الى مستلم الكترونات نهائي للنمو . ومثل هذا المسار شائع في البكتريا متباينة التخمر الاخرى . وسلوك مسار حامض السكسينيك يمكن ان يؤدي الى اختلاف المنتجات المتوقعة ، والمسارات المذكورة اعلاه وتداخلاتها موضحة في الشكل (6)



شكل 6 : مسار حامض السكسينيك في التخمر المتباين

وقد وجد ان مسار تحويل السترات الى حامض السكسينيك شائعا في البكتريا المعوية متباينة التخمر المعزولة من حيوانات مختلفة وكذلك البكتريا ذات العلاقة بالنباتات خاصة العصيات اللبنية .

وتساهم السترات في تفكيك اللاكتات تحت الظروف اللاهوائية وهذه الفعالية تكون بطيئة وتلاحظ بعد مدة حضن طويلة وعندها لا يحصل نمو وان كانت الخلايا تنتج كميات إضافية من ATP وهذه تستعمل في عمليات السيطرة الخلوية والتي بدورها تساعد الخلايا على البقاء حية والمحافظة عليها . ونواتج هذه الحالة أي التخمر المتزامن للسترات واللاكتات هي حامض السكسينيك والخلات والفورمات وثنائي اوكسيد الكاربون مما يشير الى ان مسارات هذه النواتج تكون فعالة تحت هذه الظروف .

ان الاختلاف في استهلاك السترات بين البكتريا المختلفة ربما يعتمد على وجود او غياب الانزيم Oxaloacetate decarboxylase ، فعند وجوده فأن الخطوة الاولى لاستخدام السترات تؤدي الى زيادة كمية البايروفات مما يغير نمط النواتج النهائية للتخمر مثل إنتاج الأسيتون ، وعند غيابه يفعل مسار حامض السكسينيك الموضح اعلاه .

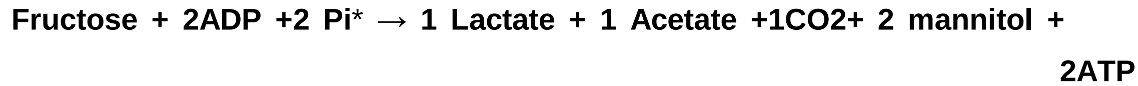
الكليسرول

هناك العديد من البكتريا متباينة التخمر مثل *Lb. brevis , Lb. reuteri , Lb. buchneri* يمكن ان تستعمل الكليسرول مستلما للالكترونات بشكل مرافق لتخمر الكلوكوز اللاهوائي ، ولذلك يلاحظ ان العديد من السلالات التي تخمر الكلوكوز بمستوى واطئ او لا تخمره يمكن ان تقوم بعملية التخمر أذا أضيف الكليسرول ويؤدي هذا الى تغير نمط المنتجات النهائية المتكونة . ولعل أبرزها ما يحدث في حالة العصيات اللبنية *Lb. reuteri* التي تخمر الكلوكوز الى لاكتات وكحول اثيلي وثنائي

اوكسيد الكاربون (كنواتج طبيعية للتخمر المتباين) ولكن نمط التخمر يختلف عند اضافة الكليسرول أذ يؤدي الى زيادة كمية الخلات وقلة الكحول الاثيلي وزيادة معدل النمو نتيجة لزيادة ATP الناتج من فعالية كاينيز الخلات ويمكن لهذه البكتريا ان تكون مركبا وسطيا هو 3- hydroxypropionaldehyde (3 -HEP) الذي ينتج من ازالة جزيئة ماء من الكليسرول ، وللمركب اهمية كونه احد المثبطات الميكروبية القوية ويسمى Reuterin . كما ان الكليسرول يقوم بعمليات تنظيم أيض البكتريا عند نموها على مصادر كاربونية مختلفة .

الفركتوز

يلعب السكر اكثر من دور في ايض بكتريا حامض اللاكتيك ، ففي بعض الأنواع متباينة التخمر يمكن ان يؤدي الى انتاج المانيتول . السكر يؤدي دورا مزدوجا فهو يعمل كمادة أساس للنمو وكذلك مستلما للالكترونات . فالفركتوز المضاف يخمر عن طريق 6-PG/PK المذكور سابقا ، والبعض منه يختزل الى المانيتول بواسطة الانزيم NAD^+ - mannitol dehydrogenase بشكل مشابه لعمل مستلمات الالكترونات النهائية الخارجية وهذه يساعد الخلايا في الحصول على كميات اكبر من ATP ومجمل الدورين ملخص في المعادلة الاتية :



* Pi فوسفات غير عضوية

ومثل هذه التفاعلات تكون مهمة في تخمر المواد النباتية حيث توجد وفرة من الكلوكوز والفركتوز والسكروز الذي يحوي السكرين معا . واعتمادا على ما ذكر اعلاه وجد ان العديد من بكتريا حامض اللاكتيك متباينة التخمر يمكن ان تستعمل الكلوكوز مصدرا للطاقة والفركتوز مستلما للالكترونات مما يؤدي الى زيادة معدلات النمو .

تخمرات حامض اللاكتيك – الماليك Malolactic acid fermentation

تعد هذه التخمرات مهمة من النواحي الصناعية وكذلك دراسة تحولات الطاقة وتمثيل المواد الغذائية ، فحامض ألماليك اليساري الدوران L- malic acid وليس يميني الدوران D-malic acid يمكن ان يهاجم من قبل بعض بكتريا الالبان . اذ ان عددا قليلا من بكتريا حامض اللاكتيك يمكن ان تستخدم حامض الماليك مصدرا وحيدا للطاقة والانزيمات المساعدة في ذلك Malate –dependent NAD^+ malic emzymes تساعد في ازالة ثنائي اوكسيد الكاربون من المالات لتحويلها إلى بايروفات وثنائي أوكسيد الكاربون



ثم تتحول البايرو فات الى خلات وكحول اثيلي وثنائي اوكسيد الكاربون وتكوين ATP من تفاعلات كاينيز الخلات .

والتفاعل الاخر الاكثر اهمية هو تحول المالات الى لاكتات الذي يرافق تخمر الكاربوهيدرات ويعرف Malo –lactic fermentation (MLF) ويحدث في العديد من بكتريا حامض اللاكتيك خاصة ذات العلاقة بالنباتات مثل العصيات اللبنية و Pediococci Leuconostocs ولذلك كان التخمر مهما في تخمير الخضر والفواكه الحاوية على تراكيز عالية من حامض الماليك . والتفاعل يحدث كالاتي



$$\text{Malate} \xrightarrow{NAD+} \text{Lactate} + CO_2$$

وقد اطلق على الانزيم المسئول عن التفاعل L- malate - NAD^+ carboxylase وقد يكون هذا التفاعل مرغوبا فيه او لا اعتمادا على النواتج المطلوبة .

ان ما تقوم به البكتريا من تخمير المالات المرافق لتخمير الكاربوهيدرات يفيدها في زيادة حاصل النمو ومعدله مقارنة بالنمو على الكلوكوز فقط . وقد أعزيت هذه الى عملية إزالة الحامضية من الوسط المحيط نظرا لكون الماليك له *p*Ka اقل من حامض اللاكتيك . ان تحول المالات الى لاكتات يمكن ان يوفر مستلمات الكترونات اضافية وبالتالي توفير كميات اكبر من ATP بطريق غير مباشر والحفاظ على تدرج البروتونات عبر الاغشية أي ان MLF يمكن ان يكون وسيلة غير مباشرة لضخ البروتونات .

نقل المواد الغذائية

من المعروف ان بكتريا حامض اللاكتيك ذات متطلبات غذائية كثيرة Fastidious ولغرض نموها لابد من نقل المواد بأنظمة كفؤة للحصول على النمو السريع ، وعملية نقل المواد تكون ذات ارتباط عالي بالطاقة الحيوية. وتحوي البكتريا على انظمة نقل كثيرة يمكن تقسيمها الى :

- النقل المرافق لقوة دفع البروتون pmf- driven symport سواء كان في النقل الفعال او النقل الثانوي .
- عمليات النقل المتبادل مثل نقل المواد الأولية او الطلائع Precursors ومبادلتها مع غيرها من المواد .
- النقل المرتبط بالفوسفات .
- أزفاء المجموعة Group translocation أي باستعمال نظام Sugar – PTS

وقد درست هذه الانظمة بشيء من التفصيل في الاحياء المهمة صناعيا مثل *Lc. lactis*

اولا النقل المرافق لقوة البروتون الدافعة : وهذا النظام هو الأكثر شيوعا في بكتريا حامض اللاكتيك كما هو الحال مع البكتريات الاخرى . وأساسيات النظام تقتضي وجود بروتين مرتبط بالغشاء الخلوي كما في الشكل 4 و 5 يسمى الحامل او Permease يقوم بنقل المادة عبر الغشاء بشكل يتوافق مع نقل البروتون وتنقل بهذا النظام العديد من المواد منها :

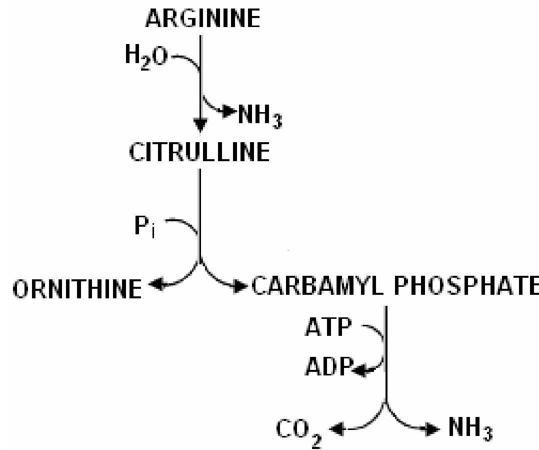
- السكريات ولعل أهمها اللاكتوز الذي درس في العديد من المكورات والعصيات اللبنية . وفي بعض الأنواع يمكن ان يوجد نظام خاص بسكر اللاكتوز Lactose – PTS اما في الانواع الاخرى فيمكن استعمال نظام نقل الكلوكوز Glucose – PTS او تنقل المواد بأنظمة خاصة بها ، ووجود نظامان لنقل المادة نفسها قد يساعد الخلايا وذلك لاختلاف الألفة Affinity للمواد ، كما يساعدها عند وجود المواد بتراكيز واطئة . وقد وجد ان مجموعة البكتريا متباينة التخمر تستعمل النظام بشكل أساسي نظرا لغياب نظام PTS فيها .
- يمكن ان يستعمل النظام لنقل العديد من الحوامض الامينية ويتوقع ان تشترك الحوامض الامينية ذات التركيب المتشابه بالحامل نفسه مثل الليوسين والايزوليوسين والفالين . والبروتينات الحاملة تختلف فيما بينها في الألفة والتنظيم بالرقم الهيدروجيني .

وتنقل البيبتيدات Peptides الصغيرة الناتجة من تأثير الفعاليات المحللة للبروتينات بالنظام نفسه إضافة الى وجود عدد كبير من النواقل او الحوامل المتخصصة . اما البرولين فأن نقله يكون بشكل خاص ، فالحامض الحر منه لا ينقل وانما يتم نقل البيبتيدات الثنائية Dipeptides والثلاثية الحاوية عليه . وفي الحليب فأن عمليات النقل تعتمد على تحلل البروتينات Proteolysis او تحلل البيبتيدات Peptiolysis فزيادة تركيز بيبتيد ما يمكن ان يغلق نظام النقل وبالتالي يؤثر على النمو بشكل سلبي (يراجع الفصل الرابع / البيبتيدات الفعالة)

ثانيا نقل الاسلاف او الطلائع والمنتجات المتعاكس Precursors – product antiport : ويستعمل النظام لنقل بعض المواد الطلائع ويمكن دراسته من دراسة بعض الامثلة في بعض الانواع .

أ- نقل اللاكتوز في *S. thermophilus* فالمعروف ان هذه البكتريا تشطر اللاكتوز الى كلوكوز وكلاكتوز ، فتخمر الاول وتفرز الثاني الى الوسط وقد عزي ذلك الى انخفاض فعالية الانزيم Galactokinase . ووجد ان نقل اللاكتوز يكون معتمدا على ATP والقوة الدافعة للبروتون أي بنظام يسمى ATP- energized pmf – dependent system . وتدفق الكلاكتوز الى خارج الخلية يكون مرافقا لتدفق اللاكتوز الى الداخل بشكل متعاكس Antiport وهذا يكون ملائما أذ يقلل الحاجة الى ATP للحصول على القوة الدافعة للبروتون .

ب - الارجينـين Arginine : العديد مـن البكتريـا يمكـن ان تحـصل علـى الطاقـة بطريقـة الفسفرة بمـواد الأسـاس عنـد تخميرهـا الحـامض الامينــي الارجينـين ، واهـم الطـرق هـو اسـتعمال Arginine deiminase (ADI) الموضح في الشكل (7)



شكل 7 : مسار Arginine deiminase

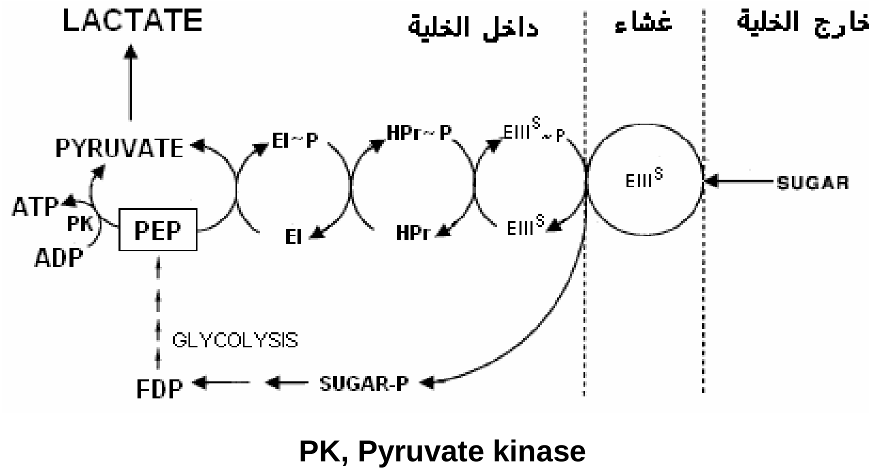
وتخمر الارجينين لا يكون المصدر الرئيس للطاقة وإنما يكون مرافقا لتخمر الكاربوهيدرات ، وهدم الارجينين ينتج الاورنيثين Ornithine الذي يفرز الى الوسط المحيط ، وقد وجد فـي العديد من انواع البكتريا ان اخذ الارجينين وإفراز الاورنيثين يعتمد على التدرج في التركيز دون الاعتمـاد علــى القـوة الدافعـة للبروتـون ، ويكـون التبـادل عبـر بـروتين مـرتبط بالغـشاء أي Antiport Arginine/Ornithine . والانزيمـات المشتركة فـي تخميـر الارجينـين تكون مـستحثة بـالارجينين وتكبح بالكلوكوز ، وتكون الجينـات الخاصـة بانزيمـات النظـام فـي اوبـرون Operon واحد . ان تخمر الارجينين يؤدي الى عدم توفره للمسارات التخليقية التي تحتاجه ، لذلك طـورت بعض الخلايـا قابلية تخليقه من الاورنيثين الذي يمكن عادة أخذه مـن الوسط بالاعتمـاد علـى القوة الدافعـة للبروتـون الخاصة بحامل الحامض الاميني اللايسين pmf- dependent lysine carrier الذي لـه بعض الألفة للحامض الاميني الاورنيثين .

ج- النقـل المـرتبط بالفوسـفات : ويـستعمل النظـام لنقـل بعـض المـواد مثـل الكلوتامـات Glutamate والكلوتامين Glutamine ، ففي المكورات اللبنية يتم أخذهم دون الاعتمـاد علـى القوة الدافعـة للبروتـون وانمـا يعتمد علـى الطاقـة الناتجـة من دورة تحلل السكر Glycolysis او الناتجـة من تـأيض الارجينين (ADI) المذكور اعلاه ، ويقل النقل بقلـة او انخفـاض ATP داخل

الخلايا وهذا يشير الى اشتراك ATP في عملية النقل او اشتراك مركبات اخرى عالية الطاقة ولذلك وصف النقل بأنه مرتبط بآصرة الفوسفات Phosphate – bound like transport .

وفي بعض الأنواع او السلالات يوجد نظام واحد لكل من الكوتامات والكلوتامين ، والنظام يفضل نقل الشكل غير المفكك للكلوتامات (أي حامض الكلوتاميك) وهذا يحدد النمو في قيم الرقم الهيدروجيني المرتفعة (القلوية) اما نقل الكلوتامين فيكون غير معتمدا على الرقم الهيدروجيني .

د – ازفاء المجموعة Group translocation ويتمثل النظام بـ PTS system المكون من ماكنة معقدة من الأنزيمات ومهمته نقل السكريات عبر أغشية الخلية بشكل متزامن مع فسفرتها ، ونظرا لكون النتيجة وجود سكر خارج الخلية وسكر مفسفر داخل الخلية لذلك فأنه لا يعتمد على تدرج التركيز . والطاقة اللازمة لذلك توفرها مجموعة الفوسفات ذات الطاقة العالية الموجودة في (PEP) ، وتنقل الطاقة عبر سلسلة من التفاعلات والبروتينات الخاصة بالنظام PTS-specific proteins المرتبطة او الواقعة في الغشاء ، ومكونات النظام وتفاعلاته موضحة في الشكل (8)



PK, Pyruvate kinase

شكل 8 : نقل السكريات عن طريق PTS

ومن مكونات النظام E I وهو بروتين ثابت تجاه الحرارة غير متخصص ، والمكون الأخر هو HPr وهو أيضا بروتين غير متخصص بالنسبة للسكريات التي ينقلها ويوجد في عدة أنظمة لنقل السكريات المختلفة .

اما E II و E III فهي تكون متخصصة ولكن ليس بشكل مطلق . والأول E II يكون مرتبطا بالغشاء ويعمل بالتنسيق مع E III المسئول عن عملية الفسفرة .

والنظام منتشر في العديد من البكتريا ويكون ذو علاقة بتخمر المواد التي ينقلها اثناء تحلل السكر أو EMP ، وهذا الاعتقاد يدعم بما وجد في العديد من بكتريا حامض اللاكتيك المتباينة التخمر التي يخلو العديد منها من هذا النظام في حين تمتلكه متجانسة التخمر . ان نقل السكر بهذه

الطريقة يتبعه مباشرة عمليات التأيض اللاحقة وبذلك يوفر كميات من PEP اللازمة لبدء دورات جديدة من نقل المواد .

ومن الشكل يتضح أن النظام يسلك طريقان رئيسان فهو يمكن أن يعطي مجموعة فوسفات للـ E I ويبدأ دورة جديدة من فعالية PTS أو يستعمل PEP من قبل الانزيم Pyruvate (PK) kinase لتكوين ATP ، ولذلك يلعب انزيم كاينيز البايروفات دورا في عملية التنظيم اعتمادا على تركيز PEP والفوسفات اللاعضوية ، اذ تنظم فعاليته بتأثير هذه المؤثرات وتفقد إثناء المجاعة او الصيام . وعند توقف كل من كاينيز البايروفات و PTS فان هذا يؤدي إلى وفرة المركب PEP ليستمر في الفعاليات الواقعة ضمن دورة تحلل السكر مؤديا الى تكوين المركبات الوسطية 3- phosphoglycerate و 2- phosphoglycerate وتجمع هذه المواد يطلق عليه PEP potential وهو يساعد الخلايا على استئناف عمليات النقل ثم أجراء عملية تحلل السكر عند توفر السكر ثانية . و PEP potential يكون مهما جدا في تزويد الخلايا بطاقة الادامة Maintenance energy اثناء المجاعة وذلك بواسطة الفعالية المتبقية لانزيم كاينيز البايروفات

ومن الجدير بالذكر ان أنظمة PTS تكون مستحثة في معظم الاحيان ويتم حثها بالسكريات الخاصة بها او مشابهات السكريات وهذا يجنب الخلايا عمليات التخليق التي لا تحتاجها . وبكتريا حامض اللاكتيك تمتلك قابلية عدم اخذ السكر عند وجود مادة مفضلة عليه وهذا ما يعرف بطرد المادة الحاثة Inducer exclusion . وعند تجمع مادة معينة مشابهة داخل الخلايا وتعريض الخلايا لمادة اخرى مثل سكر مفضل لديها فان المادة الاولى المفسفرة تفصل منها الفوسفات وتخرج الى خارج الخلايا وهذا ما يطلق عليه طرد الحاث والتي تساهم في إخراجها كل من مركبات الطاقة ATP و Sugar phosphotases ويعتقد ان الدور الاساسي فيها يعود الى البروتين HPr .

وراثة بكتريا حامض اللاكتيك

لبكتريا حامض اللاكتيك تطبيقات واسعة اضافة الى موضوع الكتاب وهو كونها إحياء علاجية فهي مهمة من نواحي طبية مثل استعمالها وسائل لإدخال اللقاحات الوقائية Vaccines وكذلك استعمالها مضايف لانتاج العديد من البروتينات العلاجية Therapeutic proteins الغريبة عليها أي Heterologous proteins ، كما انها مهمة في العديد من مجالات التقنية الحيوية . وقد بدات دراسة وراثة هذه المجموعة من البكتريا في بداية سبعينات القرن الماضي . وكان الملفت للنظر ان اغلب الصفات المهمة من مختلف النواحي هي صفات بلازميدية Plasmid borne characters ، واشارت الدراسات الى ان حوالي 5 % من كروموسوم Chromosome الخلية هو المستغل . وبتطور التقنيات الحديثة وبحلول الثمانينات أصبحت تقنيات DNA Recombinant لتشكيل المادة الوراثية متوفرة بالنسبة لهذه المجموعة من البكتريا .

ويحوي الجينوم Genome العديد من الجينات ، تقسم الى جينات أولية Primary genes وهي المسئولة عن الفعاليات الرئيسة مثل تخمير السكريات ، وجينات ثانوية Secondary genes المسئولة عن وظائف اخرى مثل إنتاج البكتريوسينات وغيرها من الصفات .

وقد تم تحديد توالي القواعد النتروجينية في المواد الوراثية DNA sequence في البكتريا *Lc. lactis* ssp *lactis* المهمة من الناحية التصنيعية ، كما انها تعد نموذجا Model لبكتريا حامض اللاكتيك وتستعمل بشكل كبير في الدراسات الوراثية ، ووجد ان جينومها يتكون من 2365589 زوج من القواعد(Base pair (bp)) وتشفر لحوالي 2310 بروتين ، وتأوي حوالي 6 عاثيات (Bacteriophages) وحوالي 43 من متواليات الإقحام Insertion sequences (IS) . اما البكتريا الاخرى التي تم دراستها على المستوى الجزئي هي *S. thermophilus* الذي وجد ان جينومها يتكون من 1824000 زوج من القواعد النتروجينية .

وفيما يلي دراسة لطرق انتقال الصفات الوراثية الطبيعية التي تحصل في مجموعة بكتريا حامض اللاكتيك .

طرق انتقال الصفات الوراثية

يمكن للصفات الوراثية الانتقال بين أجناس وأنواع بكتريا حامض اللاكتيك بالطرق التقليدية الشائعة في بقية البكتريا مثل التنبيغ Transduction والاقتران Conjugation والتحول Transformation ولكن بدرجات متفاوتة من الكفاءة . وفيما يلي توضيح لأهم الطرق :

التنبيغ Transduction

وهي عمليات نقل داخل الحي *In vivo* والمكورات اللبنية هي الأفضل التي تظهر فيها هذه الظاهرة وتكون هذه ملائمة للدراسة نظرا لحصول ظاهرة الاستذابة Lysogeny فيها بشكل كبير وعام ، ولذلك أمكن استعمال العاثيات المعتدلة Temperate phages بكثرة لنقل الصفات الوراثية واستعملت عملية التنبيغ لنقل العديد من الصفات بين البكتريا المختلفة مثل نظام تخمير اللاكتوز وكذلك الجينات المسئولة عن تخليق البروتيزات .

وبهذه الطريقة يمكن نقل الجينات الكروموسومية والبلازميدية ، ومن الظواهر المهمة ان الصفات المنقولة يمكن ان تندمج Integrated مع كروموسوم الخلية مما يضفي عليها صفة الثبات

وقد امكن استعمال طريقة التنبيغ في تجارب ناجحة لتحويل انواع اخرى من بكتريا حامض اللاكتيك مثل *S.thermophilus* او *Lb . acidophilus* .

الاقتران Conjugation

من عمليات نقل الصفات الوراثية داخل الانظمة الحية ، ونجاح العملية يحتاج الى وجود بلازميدات اقترانية Conjugative plasmids . وقد سجلت اول عملية نقل بالاقتران في المكورات اللبنية Lactococci لنقل صفة تخمر اللاكتوز في بداية ثمانينات القرن المنصرم وتلت ذلك دراسات كثيرة لاستعمال الطريقة لتحوير البكتريا وراثيا .

وأدت الدراسات الخاصة بالاقتران الى اكتشاف عناصر الإقحام Insertion elements او متواليات الإقحام Insertion sequences (IS) (التي سيأتي ذكره لاحقا) ، فعند نقل صفة تخمر اللاكتوز الى الخلايا ادت الى تجمع الخلايا تحت الدراسة التي كانت تحور باستعمال البلازميد pSK808 ، أي ظهور صفات لم تكن مقصودة من العملية الوراثية مما أدى الى الاكتشاف المذكور .

الاقتران بين الأجناس : تحصل عملية الاقتران عادة بين سلالات من النوع نفسه او بين الانواع التابعة للجنس نفسه ، ولكن يمكن ان تحصل عملية الاقتران بين اجناس مختلفة من بكتريا حامض اللاكتيك وذلك بواسطة البلازميدات الواسعة المضايف Broad host مثل البلازميد $pAM\beta_1$ وحجمه 26.5 كيلو قاعدة (Kilo base) ويحمل صفة المقاومة للمضاد الحيوي الارثرومايسين والبلازميد pIP_{501} وحجمه 30 كيلو قاعدة ويحمل صفة المقاومة للكلوراومفينكول . واستعملت هذه البلازميدات في المكورات والعصيات اللبنية وكذلك في Pediococci و Leuconostocs .

ومن البلازميدات واسعة المضايف المهمة هو pVA797 وهو مشتق من البلازميد pIP_{501} المذكور اعلاه وقد تم استبدال موقع مقاومة المضاد الحيوي بموقع تضاعف لأحد البلازميدات الصامتة او الخفية Cryptic plasmids ، وكان الناتج بلازميد كفوء في تحوير مضايف من أجناس مختلفة .

واضافة الى البلازميدات المذكورة فأنه في بكتريا حامض اللاكتيك يمكن ان تستعمل بلازميداتها الخاصة بها . وقد امكن باستعمال هذه البلازميدات نقل صفة تخمر اللاكتوز والسكروز وانتاج النايسين Nisin (احد البكتريوسينات المهمة في التصنيع الغذائي) .

التحريك الاقتراني Conjugative mobilization : البلازميدات الاقترانية يمكن ان تحرك البلازميدات غير القادرة على الانتقال او غير الاقترانية Non-conjugative plasmids ، كما انها يمكن ان تساعد في نقل الصفات الكروموسومية . فمثلا البلازميد $pAM\beta_1$ من *Streptococcus* يستعمل في تحريك البلازميدات المسئولة عن تحلل البروتينات بين أنواع مختلفة من المكورات اللبنية .

ويمكن ان تحصل تغييرات تلقائية بآليات اخرى بواسطة تسلسلات الإقحام (IS) وتؤدي الى أخطاء في تضاعف DNA او انتساخه او ترجمته وهذه تعتمد على الظروف . ويمكن استغلال هذه الظاهرة في الحصول على مواصفات جيدة للسلالات مثل حصول اندماج لعناصر الإقحام في جين *lac Z* في *Lb. bulgaricus* يؤدي الى قابلية تخمر محدودة للاكتوز وعند استعملها في تصنيع اللبن تقل عملية التحميض المتأخر اثناء مدة صلاحية المنتوج .

وقد سجلت العديد من حالات تعطيل ألجين التلقائي بواسطة عناصر الإقحام واعتمادا على التشريعات الصادرة حول الأحياء المحورة وراثيا تعد السلالات المحورة بعناصر الإقحام سلالات محورة وراثيا .

البلازميدات Plasmids :

عناصر وراثية غير كروموسومية تكون عادة بشكل حلقات دائرية مغلقة ، ويمكن ان توجد بلازميدات مفتوحة او مستقيمة . للبلازميدات مواقع بدء التضاعف Origin خاصة بها وهي تتضاعف بشكل مستقل عن تضاعف كروموسوم الخلية .

وتصنف البلازميدات اعتمادا على مدى بقائها سوية في الخلية أي على التوافقية (Compatibility) ، اذ تقسم الى بلازميدات غير متوافقة Incompatible plasmids (Inc. plasmids) وهي بلازميدات متشابه في تسلسل القواعد النتروجينية لبعض مناطق DNA لها وتكون قد نشأت ضمن مسارات تطورية متشابهة ولها مواضع سيطرة مشتركة وكذلك لأسباب اخرى لا يمكن ان تبقى سوية في الخلية ، كما ان البلازميد المقيم في الخلية يمنع البلازميد المشابه له من دخول الخلية . اما المجموعة الثانية وهي المجموعة المتوافقة Compatible group فهي البلازميدات غير المتشابهة والتي يمكن ان توجد في الخلية نفسها وفي الوقت نفسه . وهذه الظاهرة تضمن للخلايا احتوائها على مدى واسع من البلازميدات التي تساعدها في فعالياتها الحيوية . وتوجد عدة مجاميع لكل منها صفاتها الخاصة .

ويمكن ان تفقد البلازميدات عند الزرع المتكرر للخلايا أو تنمية الخلايا بدرجة حرارة عالية ولكن ليست مميتة ، كما انها يمكن ان تفقد عند معاملة الخلايا ببعض المواد مثل Acriflavine وغيرها ، وعملية خروج البلازميدات يطلق عليها تحييد او طرد البلازميدات Plasmid curing

وظاهرة فقدان بعض الصفات المهمة في بكتريا حامض اللاكتيك جذبت الانتباه الى انها قد تكون بلازميدية وفعلا سجل وجود للبلازميدات الايضية وغيرها في بكتريا حامض اللاكتيك سواء العصوية او المكورات . وبعد الدراسات المستفيضة وجد ان العديد من الصفات وخاصة الصفات المهمة هي بلازميدية وان لم تكن لكل الاجناس والانواع التابعة لهذه المجموعة من البكتريا ويمكن إجمال هذه الصفات بالاتي :

1- تخمير السكريات مثل اللاكتوز والسكروز والكلاكتوز والمالتوز والزايلوز وحتى الكلوكوز في بعض السلالات والانواع .

2- فعالية تحليل البروتينات .

3- استهلاك السترات وانتاج مواد النكهة .

4- مقاومة العاثيات Phage resistance.

5- انتاج العديد من البكتريوسينات .

6- تخليق السكريات المكوثرة الخارجية والمواد المخاطية Slime .

7- مقاومة بعض الايونات غيرالعضوية .

وغيرها من الصفات ، ومن الملاحظ ان مجمل الصفات والفعاليات بعضها اساسي لحياة الخلية والتصنيع والاخرى ثانوية للغرضين .اضافة الى ذلك فان المكورات اللبنية تحوي العديد من البلازميدات الصامتة او الخفية Cryptic plasmids التي لا تظهر أي نمط مظهري Phenotype تصل أحجامها الى 1-2 كيلو قاعدة والبعض يصل الى 100 كيلو قاعدة .

ومن اهم البلازميدات :

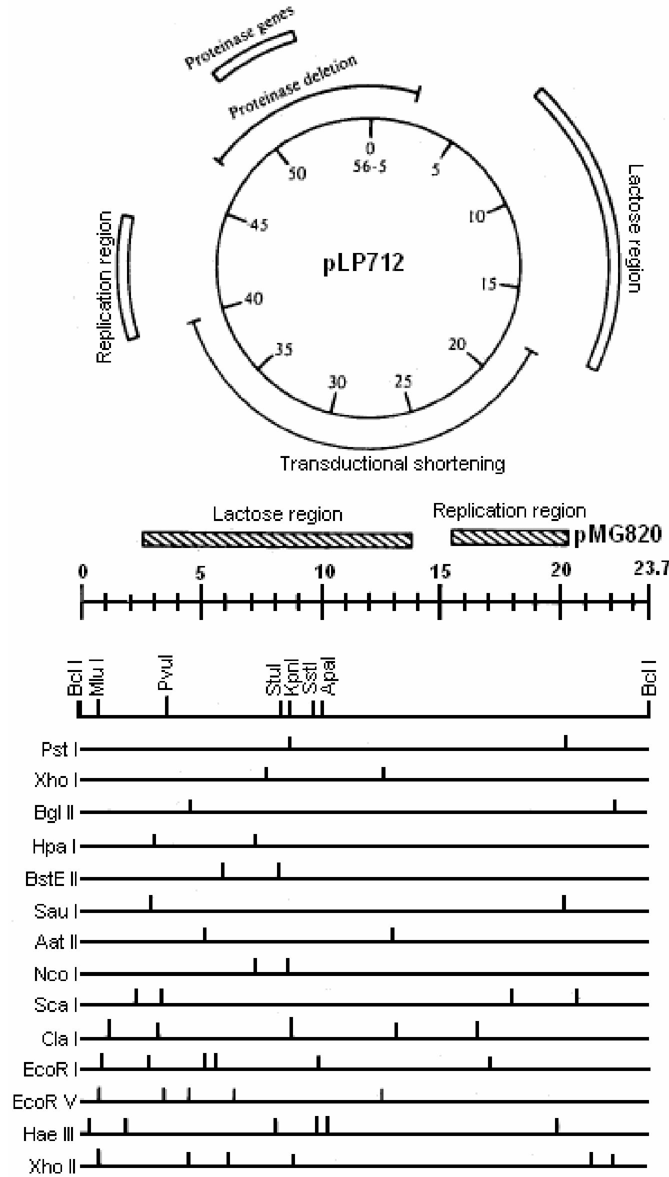
بلازميدات تخمر اللاكتوز

وجد في العصيات اللبنية ان صفة تخمر اللاكتوز تكون مرافقة لصفة تحلل البروتينات ، وتوجد على بلازميد كبير يصل حجمه الى 17 - 50 كيلو قاعدة ، ولكن قد تكون الصفتان على بلازميدات مختلفة في بعض السلالات . وكما ذكر في الفصل الخاص بعمليات الايض ان اللاكتوز في المكورات اللبنية يدخل عن طريق PTS بشكل لاكتوز مفسفر Lactose-6p ثم يعاني من الانشطار في داخل الخلية بتأثير الانزيم Phospho β–galactosidase الى كلوكوز يدخل مسار EMP وكلاكتوز مفسفر يدخل الى Tagatose pathway قبل ان ينشطر الى مركبات ذات ثلاث ذرات كاربون Triose phosphate ثم يدخل الطريق التقليدي EMP .

ان التغييرات الوراثية في نظام PTS المعتمد على PEP يمكن ان يؤدي الى جعل الخلايا غير قادرة على تخمير اللاكتوز . وباستعمال مثل هذه الطفرات وجد ان هناك علاقة بين الانزيم المسئول عن شطر اللاكتوز المذكور أعلاه وبعض مكونات النظام مثل $E\ II^{lac}$ و $Factor\ II^{lac}$. والانزيم المسئول عن الجزء الثاني من اللاكتوز بعد شطره وهو Tagatose 1,6-phosphoaldolase جيناته توجد على البلازميد أيضا وامكن نقله بطرق الهندسة الوراثية او الكلونة Cloning الى بكتريا *E. coli* .

بلازميدات تحلل البروتينات

تحلل البروتينات كما هو معروف بـالبروتيزات Proteases وتوجد الجينـات المسئولة عنهـا على البلازميدات واهمها البلازميد pLP-712 الموجود في النموذج الدراسـي *Lc. lactis* ssp *lactis* السلالة NCDO712 والموضحة خارطته في الشكل (9)



شكل 9 : خريطة البلازميد pLP712 المسؤول عن تحلل البروتينات في البكتريا *Lc. lactis* ssp *lactis* NCDO712

بلازميدات استهلاك السترات

وجـد ان عمليـة نقـل الـسترات الـى داخـل الخليـة فـي بعـض المكـورات اللبنيـة مثـل *Lc. lactis* ssp *lactis* (biovar *diacetylactis*) يكون تحت سيطرة بلازميد صـغير

حجمه 8.7 كيلو قاعدة يشفر لحامل معين Specific permease والذي يكون الأساس في بدء استهلاك السترات .

بلازميدات مقاومة العاثيات

تصاب بكتريا حامض اللاكتيك بالعديد من العاثيات والتي يمكن ان تؤدي الى إجهاض عمليات تصنيعية كبيرة وخسائر اقتصادية ، وتعد هذه المشكلة من أهم المشاكل التي تواجه صناعة الاجبان بشكل خاص . والبكتريا قد تعاملت مع هذه الوضع بشكل مختلف ، فقد وجد في خمسينات القرن الماضي ان المكورات اللبنية تحوي نظام للتعامل مع العاثيات وهو نظام تقييد وتحوير Restriction / Modification system (R/M) ولكن لوحظ ايضا عدم ثباتية صفة المقاومة للعاثيات . ووجد ان هناك عدة بلازميدات لها علاقة بنظام R/M اضافة الى علاقتها بآليات اخرى لازمة لمقاومة العاثيات مثل آلية منع امتزاز Adsorption العاثي او أحداث إجهاض للإصابة بالعاثي Abortive infection .

أ- البلازميدات المسئولة عن R/M : وأول هذه البلازميدات اكتشافا هو pME_{100} وقد وجد في البكتريا *Lc. lactis* ssp *cremoris* KH وحجمه 15.8 كيلو قاعدة . اضافة الى ان هذه البكتريا تحوي بلازميدات اخرى تشفر لأنظمة مختلفة لمقاومة العاثيات . وعند غياب البلازميد المذكور تصبح الخلايا حساسة الف مرة مقارنة بالخلايا الحاوية عليه للإصابة بالعاثي C2 . وهناك بعض الفعالية لنظام R/M موجودة على الكروموسوم . وهناك بلازميدات اخرى تشفرلنظام R/M في سلالات أخرى مهمة صناعيا مثل *Lc. lactis* ssp *lactis* التي تحوي على البلازميد pIL_6 (28 كيلو قاعدة) ، pKR_{223} (35.5 كيلو قاعدة) و pIL_7 (31 كيلو قاعدة) .

والملاحظ ان البلازميدات الحاملة لجينات النظام R/M ممكن ان تشفر لصفات اخرى مثل إجهاض الإصابة بالعاثي ، وهذه الحالة موجودة في العديد من سلالات بكتريا حامض اللاكتيك ، وتكون هذه البلازميدات اقترانية أي قادرة على الانتقال بين الخلايا . وعليه فان هذه البلازميدات تضفي المقاومة للإصابة بالعاثيات وتستعمل لتطوير السلالات وبالتالي تصبح ذات تطبيقات عملية في كافة المجالات التي تدخل فيها بكتريا حامض اللاكتيك .

ب – البلازميدات المسئولة عن تقليل امتزاز العاثيات : تسلك البكتريا طرق اخرى لمنع العاثيات اضافة الى نظام R/M ، فالبكتريا يمكن ان توقف الإصابة بتقليل عمليات امتزاز العاثيات على سطح الخلية والتي تمثل المرحلة الاولى من الاصابة بالعاثيات فمثلا البلازميد pME0030 (حوالي 47 كيلو قاعدة) الموجود في بعض سلالات المكورات اللبنية يمكن ان يقلل امتزاز اربعة انواع من العاثيات المختلفة وكذلك البلازميد pSK 112 الموجود في البكتريا

Lc.lactis ssp *cremoris* SK (55 كيلو قاعدة) يؤدي وجوده الى المنع التام لامتزاز عاثيات معينة تصيب السلالة .

ج – بلازميدات الإصابة المجهضة : الإصابة المجهضة تعني عدم قابلية العاثي على تحليل الخلايا بالرغم من حصول عملية الامتزاز بشكل طبيعي والتي تمثل الخطوة الاولى في عملية الاصابة . واول ما اكتشف من هذه المجموعة هو pN40 (63 كيلو قاعدة) في البكتريا *Lc. lactis* ssp *lactis* (biovar *diacetylactis*) المقاومة للاصابة بالعاثيات . والبلازميد من نوع البلازميدات الاقترانية ويضفي على الخلايا ايضا المقاومة لبعض المضادات الحيوية ذات الببيتيدات المتعددة مثل النايسين فهو يضفي المقاومة للاصابة بالعاثي C2 والتي تكون حاسة للحرارة وتختفي المقاومة عند درجة 37 ^{0}م أي يحصل له عملية طرد او تحييد . ومن البلازميدات الاخرى العاملة في هذا المجال pTR2030 وتكون المقاومة ايضا حساسة للحرارة اذ تثبط بدرجة 40 ْم .

يكون تاثير البلازميدات عند مرحلة حقن DNA (والتي تمثل الخطوة الثانية من عملية الاصابة بالعاثيات) والاصابة Transfection واطلاق الجزيئات الجديدة من العاثي . وقد وجد ان مرحلة الحقن طبيعية والاصابة تسير بشكلها الطبيعي ولكن الجزيئات الجديدة Progeny منخفضة جدا بالعدد . والبلازميد المذكور يضفي الحماية ضد العاثيات p2 و32 Φ ففي حالة العاثي الاول (p2) فان حوالي 70 % من الخلايا تموت ولكن لا تتحلل اما في حالة العاثي (32 Φ) فيلاحظ ان فعاليات البلازميد تتآزر مع فعالية البلازميدات المسؤلة عن R/M مؤدية الى حماية الخلايا .

واضافة الى ذلك هناك العديد من هذه البلازميدات التي يمكن ان تحمل جينات مسئولة عن آليات مقاومة اخرى .

بلازميدات البكتريوسينات والمناعة ضدها

تنتج العديد من العصيات اللبنية والمكورات اللبنية البكتريوسينات البعض منها مسيطر عليها بالبلازميدات منها Diplococcin الذي يشفر له ببلازميد اقتراني حجمه 85 كيلو قاعدة ، اضافة الى العديد من البكتريوسينات التي هي تحت سيطرة البلازميدات . ومن البلازميدات المهمة في هذا المجال البلازميد pNP_2 (131كيلو قاعدة) ، وقد وجد ان الفعالية التثبيطية توجد على قطعة من البلازميد يصل حجمها الى حوالي 18 كيلو قاعدة وعند نقل هذه القطعة الى خلايا اخرى تكون عدد كبير من النسخ (High copy number) من البلازميد الأصلي وأدى ذلك الى زيادة فعالية السلالة التي نقل اليها . ومن النواحي التصنيعية والاقتصادية يعد البكتريوسين النايسين Nisin اكثر البكتريوسينات اهمية وصفته محمولة على بلازميد وتكون

مرافقة لتخمر السكروز ولكن في سلالات اخرى يمكن ان توجد معلومات انتاج النايسين على الكروموسوم . اما صفة مقاومة النايسين فهي الاخرى تكون بلازميدية بشكل اساسي.

بلازميدات صفة المخاطية Mucoidness plasmids

صفة المخاطية مهمة في العصيات اللبنية المستعملة لإعطاء نسجة Texture ملائمة للمنتجات اللبنية ، ويسيطر عليها بعدد من البلازميدات تصل أحجامها 27-47 كيلو قاعدة اعتمادا على السلالة .

بلازميدات مقاومة الأشعة فوق البنفسجية

مقاومة الأشعة فوق البنفسجية Ultra violet ray في المكورات اللبنية يشفر لها بالبلازميدات مثل pIL7 وحجمه يتراوح بين 31- 33 كيلو قاعدة وتقع صفة المقاومة على قطعة من البلازميد يصل حجمها حوالي 5 كيلو قاعدة .

بلازميدات العصيات اللبنية الخاصة

بعد استعراض المعلومات الخاصة بالبلازميدات العائدة للمكورات اللبنية بشكل كبير . يلاحظ ان العصيات اللبنية لها بلازميداتها الخاصة ، اذ تأوي هذه العصيات عددا من البلازميدات مثل 64H *Lb.casei* متجانسة التخمر تحوي البلازميد pLZ 64 الذي يبلغ حجمه 35 كيلو قاعدة مسئول عن السيطرة على تخمر اللاكتوز الذي يتم بواسطة PEP-dependent lactose phosphotransferase system والتي تعد من الصفات الاساسية لحياة الخلية وكذلك للجوانب التطبيقية . اما في البكتريا *Lb. helveticus* فتحوي على البلازميد pLY101 الذي يشفر للانزيم β-galactosidase ، اما الجينات الاخرى المشاركة في تخمر اللاكتوز فتكون كروموسومية في هذه البكتريا ، كما انه في البكتريا *Lb. helveticus* وجد ان استهلاك N-acetyl - D – glucosamine يحمل على البلازميد نفسه في بعض السلالات .

وفي بعض سلالات العصيات اللبنية فان صفة تحليل البروتينات تكون بلازميدية وكذلك الحال مع صفة المخاطية يمكن ان تكون بلازميدية كما هو الحال مع *Lb. casei* التي يكون فيها بلازميد خاص (حجمه 7 كيلو قاعدة) مسئولا عن صفة المخاطية .

ومن الصفات الاخرى البلازميدية في العصيات اللبنية مثل *Lb. sakei* يكون نقل السيستئين (Cysteine) مرتبط ببلازميد حجمه 8.3 كيلو قاعدة .

والبكتريوسينات يمكن ان يشفر لها بالبلازميدات في العصيات اللبنية كما في *Lb acidophilus*. فانتاج البكتريوسين Lactacin F والمناعة ضده مرتبطة ببلازميد يصل حجمه الى 107 كيلو قاعدة .

ومن الصفات الأخرى هي صفة المقاومة للمضادات الحيوية التي تكون ايضا صفة بلازميدية كما في *Lb. brevis* و *Lb. acidophilus* ومنها مقاومة الارثرومايسين الموجودة على البلازميد pLUL631 والذي امكن نقله الى *E. coli* والى المكورات *Lc. lactis* ssp *lactis* .

اضافة الى ذلك تم تسجيل وجود عددا من البلازميدات الصامتة في العصيات اللبنية .

بلازميدات Pediococci

وجدت العديد من البلازميدات الصامتة في هذه المجموعة ويتراوح حجمها بين 1.9 -53 كيلو قاعدة . وتخمير الرافينوز السكر الثلاثي التي تعد صفة مهمة في هذه المجموعة يشفر لها ببلازميد كبير يصل حجمه من 36 -47 كيلو قاعدة كما في *Pe. pentoseceus* . اما في *Pe. cerevisiae* فان انتاج مواد شبيهة بالبكتريوسينات تكون تحت سيطرة بلازميد حجمه حوالي 16 كيلو قاعدة .

بلازميدات Leuconostocs والمكورات المسبحية

وجد في جنس *Leuconostoc* اكثر من 18 من البلازميدات الخفيفة ولا ترتبط بالصفات المظهرية للجنس .

بلازميدات المكورات المسبحية :

اما البلازميدات في *S. salivarius* ssp *thermophilus* فهي غير شائعة واغلبها صغير الحجم وتصل الى اقل من 10 كيلو قاعدة ولم يلاحظ ارتباطها بصفات مظهرية واضحة . واكثر البلازميدات دراسة وتوصيفا في هذه البكتريا هو pA33 (حجمه حوالي 7 كيلو قاعدة) ويستطيع البلازميد الاندماج مع الكروموسوم والانفصال عنه ، والصفات المظهرية التي تظهر على الخلايا تكون معتمدة على اندماج البلازميد مع الكروموسوم او الانفصال عنه وقد تم تحديد تسلسل القواعد فيه ووجد انه يحوي على 5 من ORFs (Open reading frames) .

حركيات البلازميدات

يمكن للبلازميدات الاندماج مع كروموسوم الخلية وكذلك حصول عمليات تبادل المواد الوراثية بين البلازميدات مما يشير الى وجود عمليات تبادل او اعادة التأشب التي لها علاقة بعملية الاقتران . فمثلا البلازميد pVA797 له القابلية على الاندماج مع بلازميدات اخرى لها

منـاطق متـشابهة معـه وكانـت الاسـاس فـي ايجـاد انظمـة تحريـك للبلازميـدات المتأشـبة Recombinant plasmids القادرة على الاندماج لنقل الجينات للسلالات غير القادرة على التحول . وقد امكن تحضير نواقل بالاعتماد على ظاهرة الاندماج . كما ان في بعض المكورات اللبنية فان الكروموسوم يمكن ان يساعد في تحريك وانتقال البلازميدات كما في pMV158 الذي يحمل صفة المقاومة للتتراسايكلين ومن جهة ثانية فان تحريك البلازميدات بالاقتران من البكتريا السالبة لصبغة كرام الواهبة الى الخلايا المستلمة من المكورات المسبحية يمكن ان يحصل عند استعمال النواقل المكوكية Shuttle vectors كما في الناقل المكون من البلازميدين pAMβ1 و pBR322 الحاوي على اصلين للتضاعف وصفة المقاومة للمضادات الحيوية التي امكن التعبير عنها في كل من البكتريا السالبة والموجبة لصبغة كرام ، ان البلازميد المصمم يحوي على اصل لعملية الانتقال من مجموعة P البلازميدية ويمكن ان يحرك بلازميد يعود الى المجموعة نفسها .

القافزات Transposons

ويطلق عليها ايضا العناصر القافزة Transposable elements او الجينات القافزة Transposable genes وهي منتشرة في جينومات الاحياء ويمكن ان تنحشر في مواقع معينة او بشكل عشوائي . والبعض منها بسيط والاخر معقد . واغلب الانواع المعقدة المكتشفة تحمل صفة المقاومة للمضادات الحيوية .

عناصر الاقحام (IS) Insertion sequence : وهي ابسط انواع العناصر القافزة وتتكون من تسلسل من القواعد تشفر لانزيم القفز Transposase محاطة بتوالي من القواعد مقلوبة الترتيب Inverted repeats (IR) . تحوي المكورات اللبنية على عدد من العناصر القافزة ومنها **(IS)** وقد عزلت بعد ملاحظة حصول اندماج بين نواقل بلازميدية غير قادرة على الاقتران مع البلازميد pRT2030 المسئول عن مقاومة العاثيات واطلق عليها IS946 وذلك في بداية تسعينيات القرن الماضي ، ويصل تشابه هذه العناصر الى حوالي 96% مع ISS1 الخاص بالمكورات اللبنية . وتلت ذلك اكتشاف عناصر اقحام اخرى مثل IS1076R وIS1076L وهذه تحيط بمنطقة يصل حجمها الى 3.3 كيلو قاعدة في المنطقة المسئولة عن تخمر اللاكتوز في البلازميد pUCL22 . ووجد ايضا ان تتابع القواعد فيها يشبه الى حد كبير توالي الاقحام الكروموسومي في المكورات اللبنية المسمى IS904 والذي يوجد امام المنطقة المسئولة عن انتاج النايسين وبعدة نسخ في الكروموسوم . وتلا ذلك اكتشاف العديد من هذه التواليات في المكورات اللبنية الى تشابه الموجودة في البكتريا الاخرى والتي تكون واسعة الانتشار في كروموسوم وبلازميد المكورات اللبنية .

وتوجد عناصر الاقحام هذه في العصيات اللبنية مثل *Lb. delbrueckii* ssp *lactis* والتي امكن بمساعدة تقنيات Polymerase chain reaction (PCR) تحديد تتابع القواعد النتروجينية فيها وتحوي على جينات تشفر لإنزيمات القفز . ومثل هذه التتابعات او التسلسلات تساعد في تشخيص السلالات ضمن النوع الواحد .

ومن العناصر القافزة الأخرى المدروسة في بكتريا حامض اللاكتيك هي Tn916 و Tn919 وهي قافزات تعود الى المسبحيات المكورة وقد امكن ادخالها بالاقتران الى العديد من سلالات المكورات اللبنية والعصيات اللبنية وافراد من جنس *Leuconostoc* وما يميز هذه القافزات احتوائها على جينات مقاومة التتراسايكلين ويمكن ان تستعمل لتثبيط الإنزيمات القاطعة او انزيمات التقييد Restriction enzymes دون الحاجة الى مواقع التعرف Recognition sites في الجين القافز ثم الانتخاب على اساس المقاومة للتراسايكلين وبغياب المضاد الاخير يمكن استئصال الجين القافز بدقة عالية تاركا الجين الاصلي بفعاليته وتركيبها الأصلي وهذه تكون من العوامل المساعدة في هندسة بكتريا حامض اللاكتيك بنجاح كما سياتي ذكره لاحقا . وتختلف الجينات القافزة المذكورة (Tn916 و Tn919) وكذلك غيرها من الجينات القافزة الاخرى في فعالياتها ، فعلى سبيل المثال فان (Tn919) يقحم نفسه في عدة تواليات او مواقع في جينوم *Lc. lactis* ssp *lactis* 712 وتكون هناك مناطق مخصصة وساخنة لاندماجه وقد تكون هناك جينات قافزة اخرى وجينومات لبكتريات اخرى تحوي على مثل هذه المناطق الساخنة ، ولكن هذه درست في البكتريا المذكورة باعتبارها نموذجا دراسيا للعديد من الدراسات الوراثية .

الهندسة الوراثية في بكتريا حامض اللاكتيك

مما تقدم تتضح أهمية هذه المجموعة من البكتريا ، ومن جهة ثانية حصول التطور السريع في الهندسة الوراثية Genetic Engineering ونقل الجينات بين الاحياء ضمن عملية الكلونة Cloning ، فكان لا بد من التقاء الجانبين لتطوير ما ممكن الاستفادة منه اكثر من بكتريا حامض اللاكتيك وهناك العديد من المنتجات التي أنتجت في بكتريا حامض اللاكتيك بعد تحويرها الوراثي (كما سيأتي ذكره لاحقا) .

التأشب الوراثي في بكتريا حامض اللاكتيك :

أثبتت الدراسات وجود أنظمة تأشب Recombination في هذه المجموعة من البكتريا ومنها أنظمة الإصلاح Recombination DNA repair كما أن وجود بلازميدات مسئولة عن مقاومة الأشعة فوق البنفسجية يشير الى وجود عمليات الإصلاح وإعادة التشكيل او التأشب . ويعتقد

ان المجموعة تحوي على نظام SOS (Save Our Souls) المستحث مثل ذاك الموصوف في *E.coli* كما يظهر ذلك في حالة ظهور الاستذابة بالنسبة لبعض العاثيات وإمكانية حثها بالأشعة فوق البنفسجية او Mitomycin C والتي لها علاقة بـ SOS المستحث .

وعلى العموم فبالإضافة الى التأشب او التشكل الوراثي المذكور أعلاه بتأثير المؤثرات هناك تأشب وراثي طبيعي في بكتريا حامض اللاكتيك والذي يحدث :

1- الطريق الاعتيادي الذي يحصل عند انتقال DNA الكروموسومي من سلالة الى أخرى بطريقة التنبيغ والاقتران ويطلق عليه التأشب العام General recombination ويحتاج الى وجود تشابه في تسلسل القواعد النتروجينية لمناطق ملائمة بين نوعي DNA إضافة الى توفر المستلزمات الوظيفية الأخرى في الخلايا . وعندما يكون DNA المندمج مع الكروموسوم بلازميدي قد يؤدي الى مضاعفة البلازميد وتكون هذه الظاهرة موجودة عند وجود ضغط انتخابي Selective pressure . وقد أمكن دراسة تفاصيل هذه الظاهرة بعزل طفرات من *Lc. lactis* *lactis* ssp التي ينقصها نظام التأشب Recombination –deficient باستعمال بعض المطفرات الكيماوية .

2- التأشب الأخر هو الناتج من فعالية العناصر الوراثية القافزة وهذه لا تعتمد تماما على وظائف ومستلزمات المضيف وتحتاج الى تشابه في تسلسل قصير ليكون هدفا لاندماجها .

ويمكن ان تستغل القافزات لفائدة المضيف مثل ISL1 القافز الذي اكتشف من منتصف الثمانينات في البكتريا *Lb. casei* الذي يمكن ان يغير حالة العاثي من النوع الضاري الى عاثي استذابة وذلك (ربما) بعملية التثبيط ألإقحامي Insertional inactivation التي تمارسها القافزات عند انحشارها وسط ألجين مؤدية الى تعطيل فعاليته والتي تستغل بكثرة في الهندسة الوراثية خاصة عندما تكون القافزات من النوع المعقد أي التي يشفر بالإضافة الى إنزيم القفز الى المقاومة لبعض المضادات الحيوية .

الطرق المساعدة في نقل الصفات الوراثية

بالإضافة الى ما ذكر أعلاه من طرق نقل الصفات الوراثية داخل الأنظمة الحية لهذه المجموعة من البكتريا ، فان نقل الصفات الوراثية خارج الأنظمة الحية قد طورت أيضا ، وشملت عدة توجهات :

1- اندماج الجبيلات المجردة Protoplast fusion :

أمكن تحضير الجبيلات المجردة ودمجها باستعمال Polyethylene glycol (PEG) في المكورات اللبنية في مطلع الثمانينات وأمكن بهذه الطريقة الحصول على مجموعة من الصفات الوراثية الكروموسومية والبلازميدية. وقد أمكن استعمال الطرق بين أجناس مختلفة

Intergeneric كما في دمج *Lc. lactis* ssp *lactis* مع *Bacillus subtilis* وكذلك أمكن دمج البكتريا الأولى مع *Lb .reuteri* إضافة الى استعمال الطريقة لدمج سلالات مختلفة تعود للنوع نفسه ولكن بنمط بلازميدي مختلف ونتج عن ذلك احتواء الخلايا المحورة والمدمجة على بلازميدات الأصول .

وتتأثر عملية دمج الجبيلات المجردة بالعديد من العوامل منها الوزن الجزئي للـ PEG المستعمل وتركيز ونوع الدارئ Buffer المستعمل والايونات الموجودة فيه ، وكذلك تتأثر بعمر الخلايا المستعملة قبل تحضير الجبيلات المجردة منها . وقد أمكن الحصول على خلايا محورة بمعدل 10^4-10^6 / مايكرو غرام من DNA .

وقد وجد ان كفاءة دمج البروتوبلاستات في العصيات اللبنية اقل كفاءة من المكورات اللبنية وسجلت عمليات دمج بكفاءة واطئة في البكتريات *Lb. salivarius* , *Lb. reuteri* , *Lb. fermentum* , *Lb. plantarum* في أوقات متأخرة مقارنة باستعمال التقنية في المكورات اللبنية .

2- استعمال الأجسام الدهنية Liposomes

نظرا لطبيعة الدهون الغشائية الكارهة للماء فقد تم اللجوء الى استعمال الاجسام الدهنية لادخال المواد الوراثية ، وقد استعملت الطريقة لتحوير *Lb. casei* وراثيا ، أذ امكن ادخال DNA بلازميدي مغلف في جسيمات دهنية وكانت العملية كفوءة جدا أذ امكن تحويل 10^5- 10^6 خلية / مايكرو غرام DNA ، وعملية التحول هذه أدت الى اندماج DNA البلازميدي في كروموسوم الخلية ، في حين كانت هذه الطريقة اقل كفاءة عند استعمال البكتريا *S. salivarius* ssp *thermophilus* .

3- التثقيب الكهربائي Electroporation

نظرا لمحدودية نجاح عملية دمج الجبيلات المجردة خاصة في السلالات الصناعية المهمة من العصيات اللبنية لذلك استعملت طريقة التثقيب الكهربائي لغرض تغيير الصفات الى الناحية المرغوبة .

والأساس في الطريقة جعل كل من الجدار الخلوي Cell wall والغشاء الخلوي Cell membrane يسمح لدخول DNA بالاعتماد على الكهربائية ، والطريقة استعملت أساسا لتحويل بعض الخلايا حقيقية النواة . وفيها تعلق الخلايا في دارئ ذو قوة أيونية واطئة وتركيز عالي من السكروز (0.3 مول) او الكليسرول بتركيز 15% ، ثم تبرد الخلايا وتعرض لنبضة او عدة نبضات كهربائية ومدى متغير من الفولتية التي تقاس عادة بكيلو فولت / سم (kV/cm) ، اما DNAفيعلق في دارئ التثقيب ، ولذلك وإثناء هذه النبضات الكهربائية يحدث تخلخل في الجدران

والأغشية مؤدية الى أحداث ثقوب (آنية) تساعد في دخول جزئيات DNA الكبيرة الحجم . وتحتاج العملية الى تحديد الظروف المثلى مثل كثافة الخلايا ووسط النمو وكذلك طور النمو بالنسبة للخلية اضافة الى مؤشرات اخرى .

وأثبتت الطريقة كفاءة في تحويل الخلايا التي لا تتحول بسهولة مثل بعض العصيات اللبنية والمكورات اللبنية و Leuconostocs و Pediococci ، وتستعمل بصفتها طريقة ناجحة لتحويل اغلب السلالات والمكورات اللبنية بالدرجة الاولى والعصيات اللبنية بعدها هي التي حظيت بالدراسات الوراثية المفصلة مقارنة مع بكتيريا حامض اللاكتيك الأخرى مثل Pediococci و Leuconostocs .

وقد طورت عدة أنظمة للحصول على بكتريا حامض اللاكتيك محورة وراثيا Genetically modified lactic acid bacteria (GM-LAB) منها أنظمة كلونة Cloning systems وانواع من Chromosome modification systems واخرى للتعبير Expression systems . واكثر الطرق استعمالا لنقل الصفات الوراثية هي التثقيب الكهربائي واستعمال النواقل المتضاعفة ذاتيا Self-replicating vectors ، اضافة الى استعمال طرق الاقتران والتنبيغ ، وهذه الانظمة توفر انماطا مختلفة من التعبير البعض منها اصيل ولا يحتاج الى حث وقد يكون ذلك باستعمال انظمة تحوي على ممهدات صناعية Synthetic promoters ، وتوجد انظمة تعمل تحت الحث مثل استعمال Nisin induced controlled expression systems الذي يسمح بتعبير مفرط اعتمادا على تركيز النايسين .

كلونة الجينات في المكورات اللبنية Gene cloning in lactococci

من المعروف ان اهم مستلزمات عملية الكلونة هو توفر نواقل Vectors ملائمة وهذه اما ان تكون :

1- نواقل أساسها بلازميدات اقترانية كبيرة .

2- نواقل أساسها بلازميدات صغيرة صامتة من بلازميدات المكورات اللبنية .

النوع الاول من البلازميدات الكبيرة الموجودة في البكتريا الموجبة لصبغة كرام والتي تنتمي الى MLS – resistance group ، ومنها النواقل المشتقة من pIP 501 ، pAMβ1 والمستعمل منها المحور حيث حصلت عملية حذف تلقائي أدى الى فقدانها لقابلية الاقتران ولكن رفعت عدد النسخ (Plasmid copy numbers) الناتجة منها يعني انها حافظت على قابليتها على التضاعف والتعبير عن جينات المقاومة للمضادات الحيوية كواسمات وراثية Markers . كما ان هذه المجموعة لا تظهر فيها نسخ مفردة من أشرطة DNA كمركبات وسطية مما يزيد من ثباتيتها الوراثية في عمليات الكلونة .

اما المجموعة الثانية والتي اساسها بلازميدات صامتة من المكورات اللبنية ، فهذه البلازميدات بحالتها الطبيعية تكون غير مفيدة ولذلك تعلم بواسمة وراثية محددة وعادة تستعمل لذلك صفة المقاومة للمضادات الحيوية وقد استعمل هذا التوجه في تصميم الناقل pGK12 ومشتقاته وذلك بالاعتماد على منطقة بدء التضاعف Replicon من البلازميدات pWV01 من *Lc. lactis* ssp *cremoris*. وكذلك حضر الناقل pCK 1 ومشتقاته من منطقة تضاعف البلازميد pSH 71 الموجودة في *Lc. lactis* ssp *lactis*. وجرت العديد من المحاولات للتعبير عن جينات لا تعود الى بكتريا حامض اللاكتيك ومنها التعبير وانتاج Bovine prochymosin واللايزوزايم Lysozyme لبياض البيض والانزيمات المحللة لحلقة البيتا لاكتام β - lactam في البنسيليات (β-lactamases) . وعمليات الانتاج هذه تعني تزويد الخلايا بإمكانية إفراز البروتينات الناتجة من التعبير عن الجينات ، وكان ذلك ممكنا وأفرزت الخلايا البروتينات التي استلمت جيناتها وذلك بالانتخاب العشوائي لبعض لتواليات الإشارة Signal sequences الموجودة على الكروموسوم والتي تشابه مثيلاتها في البكتريا الموجبة لصبغة كرام ولعل اهم الإشارات التى استعملت والتي تم تحديد تسلسل القواعد فيها هي من المكورات اللبنية مثل جينات *usp* 45 *prt* P *prt* M .

وامكن كلونة العديد من الجينات في المكورات اللبنية منها جينات مسئولة عن انزيمات تحلل البروتينات وكذلك انظمة استهلاك اللاكتوز وانزيمات نقل السترات ، وجينات انتاج البكتريوسينات مثل النايسين وبكتريوسينات اخرى لا تعود الى مجموعة النايسين او المشابه له ، اضافة الى نقل بعض الجينات الكروموسومية .

كلونة الجينات في العصيات اللبنية Gene cloning in lactobacilli

ان التطورات في هذه المجموعة من البكتريا تأتي بدرجة متأخرة عن تلك الخاصة بالمكورات اللبنية ، وذلك لصعوبة تحول هذه الخلايا وان كانت هذه المشكلة قد تم التغلب عليها باستعمال طريقة التثقيب الكهربائي .

ومن النواقل المستعملة هي التي طورت من بلازميدات صغيرة صامتة أضيف اليها بعض الواسمات الوراثية مثل المقاومة للمضادات الحيوية ، وبعض هذه النواقل تستطيع التضاعف في عدد من المضايف منها *E. coli* ولذلك استعملت في تحضير النواقل المكوكية . وهناك مشكلة اخرى في هذه المجموعة من البكتريا وهي عدم الثباتية مقارنة بالمكورات اللبنية ، كما ان عملية الاندماج مع الكروموسوم سواء بالعبور المنفرد او المتضاعف لم تثبت بشكل واسع .

وقد استعملت طريقة التثقيب الكهربائي كما ذكر اعلاه لتحويل هذه المجموعة من البكتريا ، كما في تحويل *Lb. bulgaricus* المهمة صناعيا لنقل DNA غريب (Heterologous DNA)

ولكن كانت بكفاءة واطئة وصلت الى 10- 20 % من الأنواع المستعملة . وفي البكتريا المذكورة (*Lb. bulgaricus*) ركزت الدراسات على مسار Lactose permease الذي تم تحديد تتابع القواعد النتروجينية في قطعة DNA المسئولة عن الحامل او الناقل ، وكانت هذه الدراسات متوازية مع دراسة استهلاك اللاكتوز في البكتريا *Lb. casei* التي امكن تحديد تسلسل القواعد النتروجينية في اوبرون اللاكتوز ، واستعملت بكتريا *E. coli* كمضيف وسطي للدراسات .

وبعد النجاحات التي حصلت في جنس العصيات اللبنية استعملت للتعبير عن جينات غريبة ومنها نقل والتعبير عن الجينات المسئولة عن الوميض الحيوي Bioluminescent في البكتريا *Lb. casei* أي الجينات *lux alb* تحت سيطرة تسلسل ممهد من الخلايا نفسها . وكذلك امكن نقل الجينات المسئولة عن انتاج الانزيم المحلل للنشأ α-amylase في *Lb. plantarum* ولكن باستعمال ممهدات قوية مشتقة من بكتريا غير العصيات اللبنية . واستهدفت عمليات التحوير *Lb. plantarum* اكثر لأهميتها في عملية السيلجة Silage أذ ادخلت اليها الجينات المسئولة عن انزيمات Endoglucanase من بكتريا الكلوستريديا Clostridia .

كما حورت بعض العصيات اللبنية لتنتج الانزيم المحلل للبنسيلين والذي نقل من المكورات العنقودية *Staphylococcus aureus* ولعل هذه الخطوة تكون مهمة جدا في العمليات التصنيعية عندما يحوي الحليب على بقايا من البنسيلين ومشتقاته والتي تعيق العملية التصنيعية . اضافة الى نقل الجينات المسئولة عن تحليل الدهون من المكورات العنقودية ومثل هذه تكون اساسية في عملية انضاج الاجبان .

وهذه الامثلة والنتائج تشير الى ان العصيات اللبنية هي ذات مواصفات جيدة لإفراز البروتينات والتى يمكن ان تستعمل في تطوير البوادئ المستعملة .

صفات النواقل في بكتريا حامض اللاكتيك

مما سبق تبين ان لعمليات الكلونة احتياجات أهمها النواقل ، واكثر المتضاعفات Replicons المستعملة هي pWVOl و pSH71 والاثنين بلازميدات صغيرة يشتركان في العديد من الصفات وتسلسل القواعد فيها ولكن الاختلافات البسيطة في تلك القواعد ادى الى الاختلاف في عدد النسخ التي تنتخها وهذه احد الصفات المهمة في كون الناقل ناجح فالناقل pWVOl في *Lc. lactis* يكون عددا قليلا من النسخ اما pSH71 فيكون عددا كبيرا ، ويمكن للناقلين ان يتضاعفا في عدد كبير من البكتريا الموجبة لصبغة كرام وحتى في *E. coli* والتضاعف في الاخيرة ادى الى التسريع وتطوير العديد من عمليات الكلونة لذلك فبجانب زيادة عدد النسخ فان وسع المضايف ساعد في معرفة دور الناقل في التعبير عن الجينات . ولكن ما يعيق استعمال هذه النواقل وغيرها هو ظهور

نوع من عدم الثباتية للـ DNA الغريب المربوط اليها وقد يعود ذلك الى نمط التضاعف الذي يؤدي الى توليد تراكيب وسطية مفردة من أشرطة DNA .

وتلا ذلك بناء جيل من النواقل المذكورة اعلاه مع إدخال تطويرات كبيرة فيها مثل وجود عدة مواقع للكلونة وكذلك ظهور نواقل للمسح والتحري عن المواقع المسئولة عن عمليات التنظيم مثل الممهدات ومناطق إنهاء الانتساخ Terminators او التواليات التي تساعد في إفراز البروتينات اضافة الى تصميم وبناء نواقل اخرى تتداخل مع مواقع معينة في فعالية الخلية .

نواقل الاندماج Integration vectors

من المعروف عادة ان عملية اندماج المادة الوراثية في كروموسوم الخلية تضفي الثباتية على الصفات المنقولة وهذا مرغوب فيه في العمليات التصنيعية . لذلك حضرت بعض النواقل لهذا الغرض واستعملت فيها بلازميدات الخلايا السالبة لصبغة كرام مثل pBR_{322} او بلازميدات من خلايا موجبة لصبغة كرام مثل pE_{194} ، pSC_{101} ، pTB_{19} مع متضاعفات من بلازميدات خفية ، ووجد ان البلازميدات تندمج بعملية عبور منفردة او بعمليات عبور مضاعفة وهي اقل حدوثا . وهذه توفر فرصة لاندماج قطع من DNA مع كروموسوم الخلية .

نواقل الدرجة الغذائية Food grade Vectors

بما ان التطبيقات الصناعية لبكتريا حامض اللاكتيك تكون الأغذية بشكل رئيس ، او ان الإحياء يتم تناولها مباشرة مثل الأدوية لذلك اهتمت التشريعات (كما سيأتي ذكره لاحقا) بهذه النقطة بشكل كبير . فالأحياء المحورة يجب ان لا تحوي على DNA ممنوع أكله او يؤدي الى تأثيرات سلبية على المضيف ولعل اهمها صفة المقاومة للمضادات الحيوية التي تستعمل بشكل كبير أثناء عملية الكلونة والهندسة الوراثية لوسم النواقل ، لذلك استبدلت هذه الصفات بصفات اخرى او واسمات اخرى مثل قابلية تخمير اللاكتوز وقد وجد ان ألجين *lac F* هو الملائم في عملية الانتخاب ومثل هذه الصفة تكون ثابتة عند استخدام اللاكتوز مصدرا وحيدا للكاربون .

والواسمة الاخرى الملائمة في المكورات اللبنية هو نظام تحليل البروتينات لذلك استخدم الانزيم X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase (X-PDAP) وهو انزيم متخصص لإطلاق بيبتيدات ثنائية من البيبتيدات القصيرة الحاوية على البرولين .

ومن الواسمات الاخرى المستعملة هو ألجين المنظم لتخليق الانزيم DNA thymidylate synthetase (*thy* A) واستعمل بنجاح في المكورات اللبنية ونظرا لكونه يعمل في مسارات عامة لذلك كان بالإمكان استعماله في عدد كبير ومختلف من انواع بكتريا حامض اللاكتيك . واستعملت أيضا صفة المقاومة الداخلية لبكتريوسينات المكورات اللبنية لبناء نواقل ملائمة في الأغذية مثل مقاومة النايسين ووجد انه ملائم جدا في انتخاب الخلايا المحولة .

وهناك العديد من الجوانب الوراثية التي تناولتها الدراسات ولعل ما ذكر منها هو في حدود العموميات . كما ان مجال دراسة وراثة هذه المجموعة من البكتريا يعد من المجالات النشطة التي تشتد المنافسة فيها نظرا لعلاقتها بالنواحي الصحية والتغذوية للإنسان والحيوان وبالتالي علاقتها بالنواحي الاقتصادية التي تكاد تكون المحرك للعديد من فعاليات الإنسان .

فعاليات واستخدامات بكتريا حامض اللاكتيك المحورة وراثيا

اسفرت عمليات التحوير الوراثي سواء باستعمال الطرق التقليدية مثل التطفير او عمليات الكلونة عن إنتاج العديد من المواد البعض منها لا يصب في النواحي العلاجية ومنها :

1- انتاج مركبات النكهة : فقد أمكن الحصول على إنتاج مركبات نكهة مثل نكهة الموز والحمضيات والخوخ والأناناس (Pineapple) والتوت الارضي Strawberry (الفراولة او الفريز) بعد نقل الجينات من أحياء بعيدة عنها . أما النكهات الأخرى الخاصة بمنتجات الألبان فقد أمكن الحصول على نكهة ثابتة في حليب الخض Butter milk وذلك بتعطيل ألجين *ald* B الذي يشفر للأنزيم α-acetolactate decarboxylase بواسطة البلازميدات التي يمكن ان تزال من البكتريا . وقد امكن زيادة نكهة الزبد بزيادة المركب ثنائي الاستيل بعد إجراء التطفير العشوائي للسلالات المستعملة باستعمال المطفرات الفيزياوية مثل الأشعة فوق البنفسجية وباستعمال المطفرات الكيماوية مثل Nitrosoguanidine (NTG) .

وقد شهد مجال صناعة الاجبان التطبيقات الأكبر وذلك لحساسية هذه الصناعة لان الحليب لا يتعرض الى عمليات تعقيم تقضي على الأحياء المرضية او المحللة للبروتينات . وتم الحصول على سلالات ذات تعبير مفرط للجينات المسئولة عن تحليل الببتيدات Peptidases genes باستعمال بلازميدات خاصة . وهذه يمكن ان تحسن نكهة الجبن . وأمكن أيضا زيادة فعالية مثل هذه الإنزيمات كما في زيادة التعبير عن Aminopeptidase (*pepN*) من البكتريا *Lc. lactis* إضافة الى زيادة التعبير عن الجينات الأخرى العاملة في هذا المجال مثل *pepG , pepI , pepC , pepX* في البكتريا *Lb. helveticus* وكذلك الجينات *pepW, pepI , pep L* من البكتريا *Lb. delbrueckii* عند نقلها من البكتريا *Lc. lactis* . كما ان نقل ألجين *gdh* من البكتريا *Peptoniphilus assacharolyticus* الذي يشفر لإنزيم نزع هيدروجين الكلوتامات Glutamate dehydrogenase الى *Lc. lactis* والذي أدى الى زيادة مركب α-Ketoglutarate ويساعد في تفكيك الحوامض الامينية وتطوير نكهة الجبن .

إضافة الى ما ذكر فان عمليات انضاج الجبن تعتمد على تحلل خلايا البادئ لإطلاق الإنزيمات لذلك فان تحلل الخلايا في بداية صناعة الجبن يكون ذو اثر سلبي ، أما في المراحل المتقدمة فتكون

مفضلة ويمكن السيطرة على إنتاج lysin ، Holin من قبل البكتريا في الوقت المناسب مما يؤدي الى عمليات انتاج جبن منضج ناجح .

كما يمكن حماية الجبن من الأحياء الضارة باستعمال أحياء مفرطة التعبير عن Food-grade Lantibiotics التي تقوم بمنع البكتريا الموجبة لصبغة كرام مثل *L. monocytogenes* من النمو والتكاثر في أثناء تصنيع الجبن وإنضاجه كما في استعمال البكتريا المهندسة وراثيا من *Lb. fermentum* .

2- مقاومة العاثيات : وتعد هذه مشكلة كبيرة جدا في عمليات التصنيع الغذائي المعتمدة على الأحياء المجهرية وبشكل خاص البكتريا التي تصاب بالعاثيات خاصة وان العديد من العمليات الإنتاجية الكبيرة لا يمكن ان تتم تحت ظروف التعقيم الصارم ، لذلك تصاب البوادئ وتتحلل مما يؤدي الى خسائر اقتصادية كبيرة لذلك أسفرت الجهود عن الحصول على بوادئ مقاومة للعاثيات باستعمال عمليات التنبيغ الطبيعية والاقتران بالبلازميدات الحاوية على جينات مقاومة العاثيات ومنها :

ا- هندسة البوادئ بشكل يمنع تطور العاثي بنظام مستحث يعمل بعد حصول الإصابة .

ب- إنتاج Antisense RNA الذي يمنع ترجمة RNA للعاثي .

ج - تعطيل الإصابة قبل اكتمالها وذلك بتعطيل بعض البروتينات مثل pip الذي يشارك في عمليات امتزاز DNA للعاثي وحقنه داخل الخلية مما يؤدي الى جعل البكتريا مقاومة للإصابة .

د - يمكن استعمال آلية الإصابة المجهضة كما في المسبحيات المكورة *S. thermophilus* كما في استعمال الجينات *AbiA* ، *AbiG* .

3 - المنتجات في مجال الأغذية : وربما يعد اكبر مجالات الهندسة الوراثية بعد دمجه مع صناعات الألبان . فحماية الأغذية والمتخمرة منها من الإصابة بالبكتريا المتلفة مثل استعمال بكتريا حامض اللاكتيك ذات التعبير المفرط عن بعض البكتريوسينات مثل Food grade Lantibiotics التي تستعمل في الجبن كما ذكر أعلاه .

وتعد نسجة الغذاء من المواصفات المهمة التي يمكن تعديلها باستعمال بكتريا حامض اللاكتيك . وقد أمكن ذلك بنقل مجموعة من الجينات المسؤولة عن تخليق السكريات المكوثرة الخارجية من سلالات منتجة الى سلالات تستعمل في التصنيع ، إذ أدت السلالات المحورة الى تغيير لزوجة ونسجة الأغذية المخمرة . كما يمكن تحسين النسجة دون نقل الجينات المعينة كما يحدث في بكتريا *S.thermophilus* التي يعطل فيها ألجين المسؤول عن Phosphoglucomutase وذلك يؤدي الى تحسين انتاج السكريات المكوثرة الخارجية وبالتالي تحسين النسجة . وقد أمكن تطوير هذه الصفة في بكتريا *Lc. lactis* باستعمال الكلونة

الذاتية Self-cloning . كما استخدمت بشكل كبير للاستفادة من الشرش Whey لإنتاج مواد غذائية ذات نكهة ونسجة مرغوبة .

4 - إنتاج المواد الفعالة حيويا : من مواصفات بكتريا حامض اللاكتيك المهمة هو إضفاءها التحسينات الصحية ومنها أنتاجها للفيتامينات وغيرها ، وقد نالت هذه النقطة الاهتمام الكبير في مجالات التحويرات والتحسينات الوراثية لزيادة القيمة الغذائية للمواد التي تدخل فيها . ومن العمليات التي أجريت تعريض البكتريا *Lc. lactis* لتراكيز عالية من Roseoflavin مما أدى الى إنتاج طفرات مقاومة له وانعدم جهاز تنظيم تخليق الرايبوفلافين فيها وأدى الى زيادة إنتاج الرايبوفلافين الى مستوى 1 ملغم \ لتر وهذه تساهم بشكل كبير لسد متطلبات الجسم اليومية DRI (Daily recommended intake) والتي تقدر بـ 1.3 ملغم يوميا . وبالتحليل الوراثي وجد ان الطفرة كانت في المنطقة المسئولة عن التنظيم Regulatory sequence التي تقع أمام ألجين الأول من مجموعة الجينات المسئولة عن تخليق الرايبوفلافين .كما أمكن زيادة كمية الرايبوفلافين المنتجة باستعمال بلازميد متعدد النسخ Multicopy plasmid وممهد قوي والذي أدى الى زيادة التعبير عن جينات تخليق الفيتامين الأربعة بشكل كبير مما أدى الى زيادة إنتاجه الى 8 ملغم \ لتر .

والمركب الأخر في هذا المجال هو Folate ويحتاجه الجسم بمعدل 200-400 مايكرو كرام يوميا وهذا لا يمكن سده للإنسان في الأقطار النامية او المتقدمة . ونقصه يؤدي الى تجمع المركب Homocysteine الذي هو احد أسباب توليد الإمراض الوعائية القلبية Cardiovascular diseases . لذلك تم هندسة *Lc. lactis* وأمكن التعبير عنه وإنتاج 5-8 ملغم \ لتر وهذا يعني انه يمكن الوصول الى الاحتياجات اليومية بتناول 100 مللتر من الغذاء المتخمر .

ويمكن للخلايا المهندسة إنتاج بعض الحوامض الامينية التي قد تحتاجها بعض الجوانب من الحياة مثل إنتاج الالنين ، وقد نقل الى بكتريا *Lc. lactis* جين من بكتريا بعيدة عنها وهي *B. subtilis* ، والبكتريا الأولى سلالة لا تستطيع إنتاج اللاكتات ، ادخل إليها ألجين المسؤول عن نزع هيدروجين الالنين Alanine dehydrogenase فقامت الأخيرة بدفع البايروفات (التي لا تستطيع تحويلها الى لاكتات) الى تكوين الالنين من النوع اليميني الدوران D-alanine وبتعطيل انزيم التزامر او الراسيميز Alanine racemase أمكن تحويل كل الالنين الى L-alanine الفعال حيويا .

5- إزالة المواد غير المرغوب فيها : وهذه تعد مزية لبكتريا حامض اللاكتيك الطبيعية ولكن أمكن تضخيم تأثيرها بالتحوير الوراثي ومن امثلة ذلك :

أ- الكلاكتوز : في اللبن الطبيعي يتفكك اللاكتوز جزئيا وينتج الكلاكتوز ويكون مضرا للأشخاص الذين عندهم Galactosemia الذي يؤدي الى إعتام عدسة العين Cataract . ووجد ان بعض الطفرات التلقائية للبكتريا *S. thermophilus* التي تفرز الكلاكتوز الى الوسط المحيط ولا تستطيع استهلاكه يمكن ان تخمر الكلاكتوز بعد حصول عطب في المنطقة الموجودة امام اوبرون الكلاكتوز *gla* operon وبذلك فهي يمكن ان تزيل الكلاكتوز من الأغذية .

ب- اللاكتوز : امكن باستعمال الهندسة الوراثية انتاج اغذية حلوة خالية من اللاكتوز وهذه ملائمة للاشخاص الذين لديهم حالة عدم تحمل اللاكتوز وذلك باستعمال *Lc. lactis* بطريقة الكلونة الذاتية لتحوير الجينات المسؤولة عن قبط اللاكتوز او تحليله ، فابقي على Lactose –PTS وأدخلت جينات Tagatose - 6p pathway فالخلايا تحلل اللاكتوز ولكن تستخدم الكلاكتوز مصدرا للكاربون والطاقة وتفرز الكلوكوز الى الوسط المحيط وبذا تكون الأغذية حلوة لاحتوائها على الكلوكوز .

ج- السكريات الاخرى : ومنها تلك الموجودة في المصادر النباتية مثل البقول واهمها فول الصويا ومنها α-galactosides مثل Raffinose ، Stachyose والذي يؤدي تناولها الى اضطرابات الهضم في عدد كبير من الناس ، لان امعاء الانسان لا تنتج الانزيم α-galactosidase لذلك تمر هذه السكريات الى الجزء الأسفل من الامعاء وتخمر من قبل البكتريا المنتجة للغازات وتؤدي الى الآلام في البطن . ولذا فاعطاء المريض احياء تحوي على الانزيم او الاغذية الحاوية عليه يمكن ان يساعد على تحليلها بدلا من تركها تتحلل بالبكتريا المكونة للغازات .

6- صناعة العلف : واهمها تحضير السايلج Silage الذي يحضر باستعمال بكتريا حامض اللاكتيك واهمها *Lb.plantarum* التي تقوم بحماية الحشائش من التلف بتخفيضها للرقم الهيدروجيني . ولتسهيل اجراء عملية السيلجة تم نقل ألجين المسؤول عن انزيم Phytase وهو *Phy C* من البكتريا *B. subtilis* الى *Lb. plantarum* لتحليل الفايتات Phytate (مكوثرات الفوسفات) ، فكلونة هذا الجين يحسن من القيمة الغذائية للعلف وكذلك يقلل من تلوث البيئة بالفوسفات ، وكذلك استعملت البكتريا المخمرة التي نقلت اليها الجينات المسئولة عن تحليل النشا لزيادة النوعية التغذوية للعلف المنتج .

7- استخدامات اخرى : استخدمت البكتريا كمضايف لانتاج البروتينات ذات الحلاوة العالية .

تصنيف بكتريا حامض اللاكتيك

يمثل علم التصنيف Taxonomy حالة متحركة وغير ثابتة في الوقت الحاضر وحتى في المستقبل وذلك لعدة أسباب منها :

1- حصول تطورات كبيرة في التقنيات الجزئية والكيمياء الحياتية مما يوفر اكتشافات ومعلومات تؤدي الى رفع جنس او نوع من موضعه وإدراجه مع جنس آخر او تغيير تسمية الجنس او النوع بحيث يلاءم قواعد التسمية العالمية .

2- عمليات التبادل الوراثي في الطبيعة تؤدي الى إرباك أدق التقنيات فهذه العمليات لا يمكن إيقافها وتحصل بين الاحياء عند وجودها في بيئة واحدة ، وكذلك تعرض الاحياء للمواد المطفرة البيئية .

3- الظروف التي توجد بها الاحياء هي ليست متشابهه ولذلك تستجيب الاحياء للبيئة التي تعيش فيها وبما ان الانماط المظهرية ما هي الا تداخل المعلومات الوراثية مع الظروف الخارجية وهذا يؤدي الى الكثير من عدم التطابق بين العزلات التي تعزل لأول مرة وبين المواصفات الكثيرة المدرجة في المراجع وهو ما يطلق عليه في بعض الأحيان تغاير السلالات Strain variation فيما اذا تعدت عمليات التصنيف الخطوط العريضة لتصل الى الجنس والنوع .

4- ومما يعقد عمليات التصنيف هو ان الصفات الموضوعة ليست لكل الاحياء ولكن توضع للسلالة او السلالات الممثلة وذلك لانه معروف مسبقا وجود التغاير وعدم التطابق .

وعليه فان عملية تصنيف مجموعة بكتريا حامض اللاكتيك هي الاخرى عملية غير ثابتة. ولكن هناك اطر عامة يمكن ان تنطبق على المجموعة مثلما ذكر في موضوع الايض او التعريف بالمجموعة وهي انها موجبة لصبغة كرام ومجبرة على التخمر . وتعود العصيات اللبنية والمكورات المعوية الى مجموعة بكتريا حامض اللاكتيك الحقيقة التي تكون نسب GC% واطئة (نسب القواعد النتروجينية گوانين الى السايتوزين) وتتراوح بين 34 -51 % .

أسس التصنيف المستعملة :

1- **الشكل الخارجي للخلايا** : ويأتي في مقدمة المؤشرات المستعملة للتصنيف وكذلك تفاعل الخلايا مع صبغة گرام .

تضم العصيات جنس *Lactobacillus* و *Carnobacterium* . اما المكورات فتضم عددا من الأجناس يعتمد في تميزها على مستويات الانقسام الخلوي فالخلايا التي تنقسم بشكل متعامد تكون التجمعات الرباعية Tetrads المميزة لأجناس *Aerococcus* و *Pediococcus* و

Tetragenococcus. اما التي تنقسم بمستويات متوازية والتي تؤدي الى تكون سلاسل او مسبحيات فانها توجد في اجناس المكورات اللبنية *Lactococcus* والمسبحيات المكورة *Streptococcus* والمكورات المعوية *Enterococcus* و *Pediococcus* و *Leuconostoc* .

-2 طرق تخمير الكلوكوز : تصنف البكتريا اعتمادا على تخمير السكر تحت الظروف المثالية التي تعني وجود وفرة من السكريات وقلة من الأوكسجين ووجود المغذيات الاخرى مثل الحوامض الامينية وسوابق او أوليات الحوامض النووية واعتمادا على هذا المؤشر تقسم بكتريا حامض اللاكتيك الى :

أ- المجموعة المجبرة على التخمر المتجانس Obligate homofermentative : وهذه يعني ان السكر يتم تخميره عن طريق تحلل السكر Glycolysis وتحوله الى حامض اللاكتيك بشكل رئيس وتضم مجموعة من العصيات اللبنية .

ب- المجموعة المجبرة على التخمر المتباين Obligate heterofermentative : وتضم مجموعة من العصيات اللبنية وLeuconostocs وتستعمل مسار 6-PG/PK فقط لتخمير السكريات . والاختلاف في الإنزيمات الرئيسة في مسار تحلل السكر و 6-PG/PK هي FDP aldolase و Phosphokinase (PK) فمجبرة التخمر المتجانس تحوي انزيم الالدوليز وينقصها PK والحالة العكس بالنسبة لمتباينة التخمر . هذا الاختلاف يؤدي الى الاختلاف في النواتج النهائية ، كما ان مجموعة متجانسة التخمر لا تستطيع استهلاك السكريات الخماسية والكلوكونات .

ج- متباينة التخمر الاختيارية Facultative heterofermentative : وتشمل ما تبقى من بكتريا حامض اللاكتيك أي جزء من العصيات والمكورات اللبنية والمسبحيات المكورة و Pediococci و Vagococci و Tetragenococci والتي تمتلك موقفا متوسطا بين المجموعتين اعلاه ، فهي تشبه المجموعة الأولى (متجانسة التخمر) بامتلاكها انزيم الالدوليز بشكل أصيل Constitutive اي غير مستحث والذي يستخدم في استهلاك السكريات السداسية . ومتباينة بالنسبة للسكريات الخماسية وبعض المواد الأخرى ومنها Carnobacteria وغيرها .

ان تجميع وتصنيف هذه المجموعة اعتمادا على ايضها يمكن ان يكون من الطرق المفضلة وقد دعمته الدراسات التي شملت الانزيمات Isoenzymes وكذلك تسلسل القواعد النتروجينية في 16S rRNA (كما سيأتي ذكره لاحقا) .

3- **درجة حرارة النمو :** ويستعمل للتميز بين المكورات ، فمجموعة المكورات المعوية تنمو بدرجة حرارة 15 ْم و45ْم في حين ان المكورات اللبنية و Vagococci تنمو بدرجة حرارة 15 ْ م ولا تنمو بدرجة حرارة 45 ْ م . اما مجموعة المسبحيات المكورة فتنمو بدرجة حرارة 45ْم وان كان ذلك معتمدا على النوع وهي لا تنمو بدرجة 15 ْ م .

4- **تحمل الملح (كلوريد الصوديوم) بتركيز 6.5 %** : ويستعمل للتميز بين المكورات ايضا ، ففي هذا المجال فان معظم افراد جنس *Tetragenococcus* ينمو بتركيز يصل الى 18 % .

5- **نوع النظير البصري لحامض اللاكتيك الناتج من تخمر الكلوكوز :** ويستعمل للتميز بين الأجناس والمجاميع ، فالعصيات اللبنية تنتج خليط من النظير DL- lactic acid او تنتج النظير اليساري الدوران (L) . اما مجموعة Leuconostocs فتنتج النظير اليميني الدوران (D) .

6- **تحمل الحموضة او القلوية :** وهذا المؤشر يستعمل بشكل قليل في عمليات التصنيف .

7- **الحركة** : بصورة عامة تعد بكتريا حامض اللاكتيك غير متحركة ما عدا جنس *Vagococcus* وهي صفة غير طبيعية .

8- **النمو بوجود الخلات** : فبعض اجناس هذه المجموعة من البكتريا لا تنمو بوجود الخلات في الوسط الغذائي وعادة يستعمل المركب كعامل انتخابي لعزل العصيات اللبنية كما في وسط Rogosa Agar . ومجموعة Carnobacteria التي فصلت من العصيات اللبنية لا تستطيع النمو بوجود الخلات .

9 - **درجة تحمل الأوكسجين** : وتتميز بعض الأجناس بتحملها لتراكيز قليلة من الهواء **Microaerophilic** واخرى تنمو بشكل افضل عند غياب الاوكسجين .

وهناك فحوص ومؤشرات اخرى يمكن ان تستعمل منها انتاج الاسيتيون (-Voges Proskauer test) ، تحمل املاح الصفراء ونوع تحلل الدم Haemolysis الذي يظهر على الاوساط الغذائية الحاوية على الدم ، وانتاج السكريات المكوثرة الخارجية ، وفحص احتياج عوامل النمو ، وكذلك وجود بعض الانزيمات المهمة مثل β-galactosidase (الذي يعمل في مجال تخمر اللاكتوز) وانزيم β-glucoronidase ، وتستعمل ايضا مواصفات النمو في الحليب في التصنيف . ويوضح جدول (5) بعض المواصفات المذكورة لبعض المجاميع وأجناس بكتريا حامض اللاكتيك .

جدول 5 : بعض مواصفات بكتريا حامض اللاكتيك الفسلجية

الفحص	العصيات		المكورات						
	Carnob.	***Lactob.***	***Aeroc.***	***Enteroc.***	***Lacto Vagoc.***	***Leucon.***	***Pedioc.***	***Streptoc.***	***Tetragenoc.***
تكوين الرباعيات	-	-	+	-	-	-	+	-	+
انتاج CO_2 من الكلوكوز	-	±	-	-	-	+	-	-	-
النمو بـ 10 ْم	+	±	+	+	+	+	±	-	+
النمو بـ 45 ْم	-	±	-	+	-	-	±	±	-
النمو بـ 6.5 % NaCl	**ND***	±	+	+	-	±	±	-	+
النمو بـ 18% NaCl	-	-	-	-	_	-	-	-	+
النمو بـ pH 4.4	**ND**	±	-	+	±	±	+	-	-
النمو بـ pH 9.6	-	-	+	+	-	-	-	-	+
حامض اللاكتيك	**L**	**D,L,DL**	**L**	**L**	**L**	**D**	**L,DL**	**L**	**L**

* غير معروف

وتستعمل التفاعلات المصلية والمناعية بعد المرور بالمواصفات اعلاه وعادة تستعمل لتحديد السلالات او الضروب (Varieties) .

اما عمليات التصنيف الدقيقة وما دخل عليها من تطورات في التقنيات المستعملة تشمل استعمال الصفات الجزيئية او التصنيف الكيماوي لمركبات الخلية العامة مثل تحديد نوعية Diamino acid الموجود في المكوثر ألجداري Peptidoglycan ووجود Teichoic acid ، وتستعمل أيضا الحوامض الدهنية في الأغشية الخلوية لتحديد الجنس او النوع فمثلا *Vagococcus* و *Carnobacterium* لهم نمطا خاصا من الحوامض الدهنية تميزها عن

باقي إفراد المجموعة وتستعمل تقنية كروموتوغرافي الغاز GC لتحديد ذلك ، ويقارن نمط الحوامض الدهنية مع مكتبة قاعدة معلومات Database خاصة بالأنواع وقد أثبتت جدارة في فصل الأجناس الأنفة الذكر ولا تزال الطريقة بحاجة الى قواعد معلومات اخرى لتصبح فعالة في عمليات المسح والتصنيف . ويستعمل ايضا توالي الحوامض الامينية لبعض الإنزيمات المهمة مثل انزيم نزع هيدروجين اللاكتات LDH وكذلك تحديد مواصفاته عند الترحيل الكهربائي بالهلام Gel electrophoresis ويمكن استعمال البروتينات الخلوية الاخرى الذائبة التي تحرر من الخلايا وترحل ثم تدرس الحزم الظاهرة ، وقد وجد ان دقة دراسة نمط البروتينات مشابه لدراسة تحديد تجانس الحوامض النووية ولذا تعد من الوسائل الفعالة في تحديد الأنواع .

اما بالنسبة للنواحي الوراثية وهي الجوانب التي طالتها التقنيات الحديثة بشكل كبير ، فتستعمل في التصنيف فقديما استعملت نسب الـگوانين والسايتوزين GC% وتلت ذلك مرحلة دراسة التجانس النووي DNA/ DNA homology اذ حضرت العديد من المسابر الخاصة DNA probes لتسهيل عمليات التصنيف ويمكن اختبار المستعمرات على وسط الاكر بطرق تهجين المستعمرات Colony hybridization ، وتحتاج هذه العملية الى إقرانها بطرق التصنيف التقليدية ، اضافة الى الرجوع الى مكتبات الحامض النووي (DNA Libraries) .

ولعل التطورات العلمية الحديثة قد تقدم الحلول ربما المثلى لعملية التصنيف الشائكة ومنها دراسة تسلسل او تتابع القواعد النتروجينية في الحوامض النووية وأفضلها جينات rRNA وخاصة 16SrRNA و 23S rRNA أذ تحوي على مناطق محافظ عليها Conservative ويعتقد انها لم تتغير . إضافة الى انه يوجد بتراكيز عالية أي بنسخ متعددة تصل الى 10^4 في الخلية الواحدة .وقد استعمل تسلسل القواعد في 16S rRNA و 23S rRNA في تصنيف المكورات اللبنية والمعوية وكذلك في تصنيف العصيات اللبنية مثل *Lb. curvatus* و *Lb. pentosus* و *Lb. plantarum* و *Lb. sakei* و *Lc. lactis* ssp *lactis* و *Lc. lactis* ssp *cremoris* .

وقد ساعدت تقنية PCR في عمليات التصنيف فبواسطتها يمكن تضخيم جين معين او جزء منه من إعداد قليلة من خلايا البكتريا لتحديد تسلسل القواعد فيه ، والجينات المرشحة للتضخيم كما ذكراعلاه هي جينات rRNA أذ توفر دقة عالية للفصل بين الاحياء وتشخيصها .

وتستعمل في تصنيف مجموعة بكتريا حامض اللاكتيك تقنية Restriction endonuclase analysis (REA) وفيها يتم تقطيع الكروموسوم بأنزيمات قطع خاصة ، ثم ترحل في هلام الاكروز Agarose gel ويتم تحليل الحزم الظاهرة مع حزم قياسية وهذه الطريقة لها قابلية تميز عالية ويمكن ان تستعمل في التصنيف على مستوى النوع والجنس .

وقد تعرضت عمليات تصنيف وتسمية بكتريا حامض اللاكتيك في نهاية السبعينات ولا زالت تتعرض الى تغييرات كبيرة ، ولعل ابرز هذه التغييرات هو فصل جزء من جنس العصيات اللبنية *Lactobacillus* ليوضع في جنس جديد *Carnobacterium* وكذلك استحداث جنس جديد *Tetragenococcus* ليضم البكتريا *Pediococcus halophilus* وكذلك تعرض جنس المسبحيات المكورة *Streptococcus* الى تغيير فقد سحبت معظم إفراد مجموعة لانسفيليد Lancefield group N لتوضع ضمن جنس جديد هو المكورات اللبنية *Lactococcus* .

ويلاحظ ان البكتريا *S. thermophilus* احتفظت باسمها القديم وذلك لان لها موضعا خاصا ويطلق عليها الان *S. salivarius* ssp *thermophilus* وذلك لعدة أسباب منها ان المكورات اللبنية *Lactococcus* (الجنس الجديد المستحدث) تأوي العديد من البلازميدات في حين ان *S. thermophilus* تأوي عدد قليل 1-2 لكل خلية واهم بلازميداتها pA 33 (6.9 كيلو قاعدة) و pA2 (2 كيلو قاعدة) وتحوي قليل جدا من البلازميدات الصامتة .وتكون *S. thermophilus* عصية التحول الوراثي واكتساب جزيئات من DNA الغريبة وتردد التحول المسجل لها واطئ ويصل الى 10^{3}- 10^{4} / مايكروغرام DNA . وأشارت الدراسات الوراثية الى وجود نوع من التجانس في الجينات المسئولة عن تخمير اللاكتوز مع المكورات اللبنية خاصة الجينات التركيبية ولكن مكائن التنظيم مختلفة .

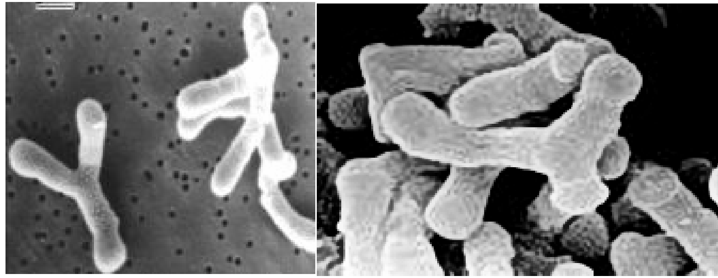
وأخيرا ونظرا لان الكتاب يهدف الى التعريف بالفعاليات العلاجية لمجموعة بكتريا حامض اللاكتيك وغيرها والتي تكون معظم الاحيان معتمدة على السلالة ، لذلك فسوف لن يتم التطرق الى وصف الاجناس والانواع لان هذه تضمها كتب اخرى .

الفصل الثالث

البكتريا المنشطرة
وبكتريا اخرى

البكتريا المنشطرة وبكتريا اخرى

بكتريا Bifidobacteria اكتشفت في نهاية القرن التاسع عشر في معهد باستور وفي أماكن اخرى ، أذ عزلت من غائط أطفال الرضاعة الطبيعية وصنفت في ذلك الوقت ولكن عملية تصنيفها لم تكن ثابتة أذ وضعت ضمن اجناس مختلفة منها *Lactobacillus , Nocardia , Tissieria , Actinomyces , Bacteriodes , Bacillus , Corynebacterium* قبل ان تميز الى جنس محدد عام 1974 . والصفات العامة لها انها تظهر بشكل حرف Y او V أي اشكال متغيرة وتظهر فيها ظاهرة تغير الأشكال Pleomorphism كما موضحة في الصورة الاتية :



ولها تأثيرات كبيرة على صحة الإنسان مما حدا باليابانيين وغيرهم من الشعوب الى إدخالها في الأغذية وتدعيم الألبان المصنعة.

صفات البكتريا المنشطرة

تصنيفها معرض للتغيير مثل باقي الاحياء المجهرية وتحوي على الأقل 24-31 نوع او اكثر . وتصنيفها في الآونة الاخيرة يعتمد على التوجهات الجزيئية الحديثة .

والصفات العامة لها انها بكتريا موجبة لصبغة گرام ، غير متحركة ، غير مكونة للابواغ ، اشكالها كما ذكر اعلاه متغيرة وتعتمد على النوع وعلى البيئة التي تنمو فيها فيمكن ان تظهر بشكل خلايا قصيرة نحيفة ويمكن ان تظهر بشكل بيضوي ، او تظهر بشكل خلايا عصوية طويلة مع ظهور الزوائد والتفرعات الواضحة لذلك سميت بالبكتريا المنشطرة ، ويمكن ان تظهر إشكال اخرى اعتمادا على الوسط الغذائي الذي تنمو فيه والذي يؤثر بشكل اساسي على N-acetyglucosamine الذي يمثل احد مكونات المكوثر ألجداري الببتيدوكلايكان مما يؤثر في الشكل الخارجي . كما ان الشكل يتأثر بالحوامض الامينية خاصة الالنين وحامض الاسبارتيك وحامض الكلوتاميك والسيرين الموجودة في الوسط وتراكيزها ، اضافة الى تأثير تركيز ايون الكالسيوم ، فانخفاض تراكيز هذه المواد يؤدي الى ظهور الشكل المتفرع والمنشطر .

اما الصفات الفسلجية فهي لاهوائية مجبرة Strict anaerobes ولكن توجد بعض الأنواع التي تتحمل الهواء Aerotolerant ولكن بوجود ثنائي اوكسيد الكاربون ، وهي لا تنتج انزيم

الكاتيلز .اما متطلباتها الحرارية ، فالحرارة الملائمة تمتد من 37-41ْ م كحرارة مثلى اما الدنيا فهي 25 – 28ْم والعظمى 43 - 45ْم . وتختلف العزلات في متطلباتها الحرارية اعتمادا على أصل عزلها ، فالسلالات المعزولة من الإنسان تكون المثلى لها 36-37ْ م ، اما المعزولة من الحيوانات فتكون المثلى 41- 43ْ م وربما وصلت بعضها الى 46ْ م والبكتريا تموت بدرجة حرارة 60ْم . ولا تنمو الخلايا بدرجة 20ْ م او اقل .

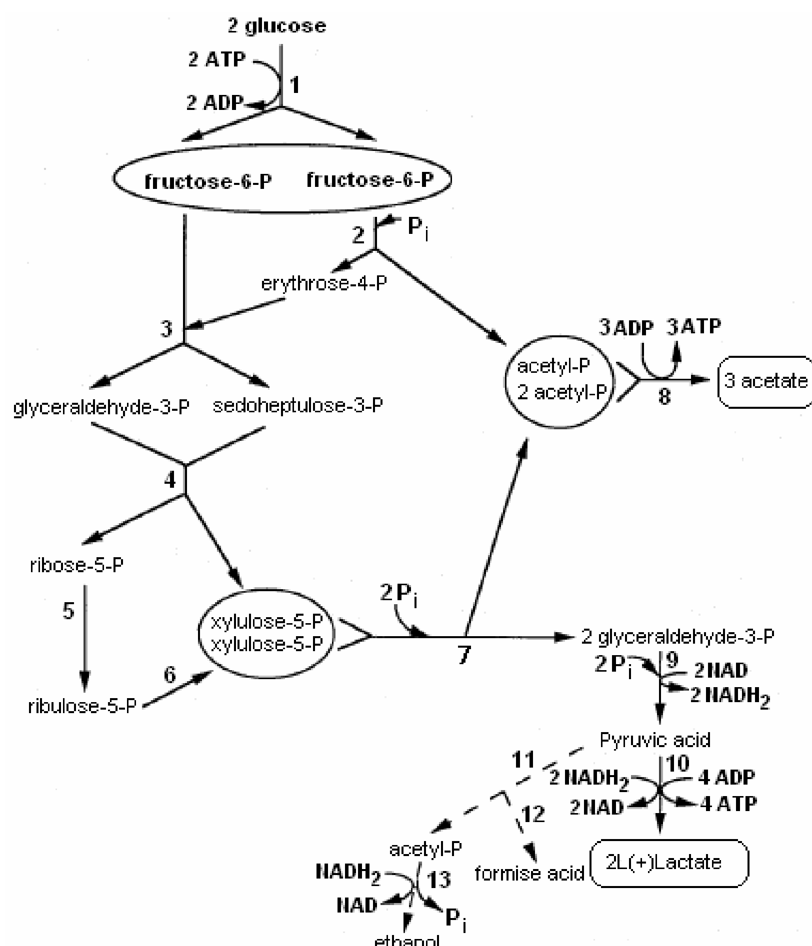
والأرقام الهيدروجينية الملائمة لها فتقع بين 6.5 - 7.0 ولا تنمو برقم هيدروجيني اقل من 5 وكذلك اكثر من 8.5 وهي قليلة التحمل للحموضة مقارنة بجنس العصيات اللبنية .

ايض البكتريا المنشطرة

الاحياء تخمر السكريات عن طريق Fructose - 6 phosphate او ما يطلق عليه Bifid shunt أذ وجد في الستينات انها تحوي على الانزيم Fructose - -6 phosphate phosphoketolase (F6PPK) الذي لا يوجد في الإحياء التي يمكن ان يحصل التباس معها مثل *Lactobacillus* و *Arthrobacter* و*Propionibacterium* و *Corynebacterium* . ولا تحوي على انزيم Aldolase و Glucose -6p dehydrogenase الموجود في العصيات اللبنية لذلك فصلت في جنس لوحدها . والمسار المذكور يميزها عن الاحياء الاخرى ، وتخمير الكلوكوز بهذه الطريق يعني تكون حامض ألخليك وحامض اللاكتيك بنسب نظرية 2:3 وان كانت النسب العملية لا تصل الى هذا المستوى وتعتمد على السلالة اذ توجد ثلاثة انواع من الأنزيمات اعتمادا على مصدر السلالة التي قد يؤثر في حاصل الناتج . والمسار موضح في الشكل (10) .

ويتضح من الشكل ان تخمير 2 مول من الكلوكوز ينتج 3 مول من الخلات و 2 مول من اللاكتات ، وإثناء المسار الايضي تنتج البايروفات التي تحول الى حامض لاكتيك (+) L بواسطة lactic acid dehydrogenase (+) L وينظم بـ Fructose - -6 diphosphate . والطريق الاخر هو شطر البايروفات بأنزيم Phosphoroclastic enzyme لتكوين حامض الفورميك وفوسفات الاستيل والذي يختزل ليكون الكحول الاثيلي لاستعادة NAD^+ ثانية . وعلى العموم توجد اختلافات بين السلالات في النواتج النهائية فالبعض ينتج حامض السكسينيك والبعض الاخر ينتج كميات قليلة من ثنائي اوكسيد الكاربون عند تفكيكه للكلوكونات Gluconate .

ولايض البكتريا المنشطرة علاقة وثيقة مع الظروف الهوائية ، فهي في العموم لاهوائية مجبرة ولكن تظهر بعض الانواع نوعا من التحمل للأوكسجين اعتمادا على الوسط الغذائي ، فعند نقل الخلايا من الظروف اللاهوائية الى الظروف الهوائية فأن هذا يؤدي الى حصول عدة حالات :



شكل 10 : مسار Bifid shunt لتخمير السكريات في البكتريا المنشطرة

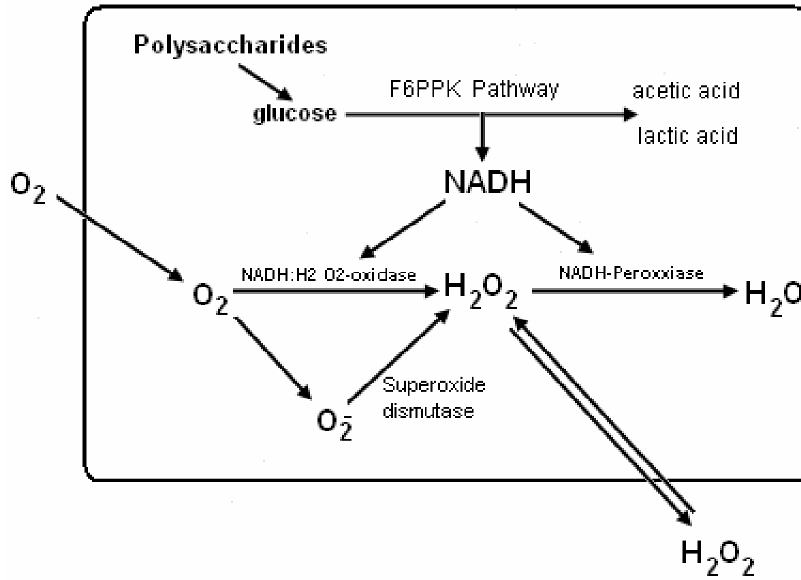
1=hexokinase and glucose-6-phosphate isomerase ; 2=fructose-6-phosphate phosphoketolase ; 3=transaldolase ; 4=transketolase ; 5=ribose-5-phosphate isomerase ; 6=ribulose-5-phosphate epimerase ; 7=xylulose-5-phosphate phosphoketolase ; 8=acetate kinase ; 9=homofermentative pathway enzymes ; 10= L(+)lactate dehydrogenase ; 11= phosphoclastic enzyme ; 12= format dehydrogenase (EC1.2.1.2) ; 13=alcohol dehydrogenase .

1- في الانواع المتحملة للهواء مثل *Bif. bifidum* يحصل نمو هوائي وتجمع لبيروكسيد الهيدروجين بكميات قليلة بتأثير أكسدة NADH كما ان البعض تحوي على Peroxidase الذي يفكك بيروكسيد الهيدروجين .

2- يمكن ان يحصل نموا محدودا وتجمع لبيروكسيد الهيدروجين الذي يسمم الانزيم الاساسي في ايض البكتريا F6PPK .

3- يمكن ان يمنع النمو ولا يتجمع بيروكسيد الهيدروجين في السلالات التي تحتاج جهد اكسدة واختزال واطئ لغرض النمو والتخمر .

والملاحظ ان وجود ثنائي اوكسيد الكاربون يؤثر على علاقة البكتريا بالأوكسجين . اما الملاحظات العامة على السلالات ذات الأصل البشري هو حصول امتصاص للأوكسجين بتأثير الانزيم NADH oxidase والذي يحصل دون الاعتماد على وجود الكلوكوز ولكن يعتمد على كمية السكريات المكوثرة التي تتجمع في الخلية ويمكن توضيح العلاقة بالشكل الأتي (11)



شكل 11 : علاقة الأوكسجين بايض البكتريا المنشطرة

والميزة الاخرى المهمة في علاقة البكتريا وايضها بالاوكسجين هو وجود انزيم NADH peroxidase وهذا يعتمد على السلالة ، فالسلالة الحساسة جدا تكون فعالية الانزيم منخفضة تسمح بتكوين بيروكسيد الهيدروجين السام او Superoxide .

احتياجات البكتريا المنشطرة

متطلبات البكتريا الغذائية معقدة ولكنها اقل من احتياجات العصيات اللبنية :

1-النتروجين : اغلب سلالات البكتريا المنشطرة تستطيع استهلاك النتروجين اللاعضوي مثل أملاح الامونيوم وهذه تحتاج وجود انزيم Glutamine synthetase و Glutamate dehydrogenase ، وهذه المجموعة من البكتريا تنتج كميات كبيرة من الحوامض الامينية ، فمثلا *Bif. bifidum* تكون كل من حامض الاسبارتيك والفالين والالنين بحدود 150 ملغم / لتر . وتوجد انواع منها لا تستطيع العيش الا بوجود النتروجين العضوي .

2-المعادن النادرة : تحتاج معظم البكتريا الى ايون المغنيسيوم والمنغنيز والحديد والأخير يعتمد استعماله على الرقم الهيدروجيني ، فأيون الحديدوز Fe^{++} يستهلك عند الرقم الهيدروجيني الواطئ ، اما ايون ألحديديك Fe^{+++} فيستهلك عند الرقم الهيدروجيني المتعادل ، ويشارك الحديد في انتاج الخلات التي تمتاز البكتريا بإنتاجها .

3-عوامل النمو : تحتاج السلالات والأنواع التابعة للجنس الى عوامل منها :

أ- Bifidigenic factors وهي عوامل تحتاجها البكتريا وملخصها موضح في الجدول (6)

وأكثر هذه العوامل هي متحللات الكازين ألبقري وخلاصة الخميرة ، والاهم فيها هي الثمالات الحاوية على Disulfide/Sulfhydryl للـ κ -casein أذ انها مهمة من الناحية الحيوية لنمو البكتريا أي ان الفعالية تكمن في *P*-κ -casein وليس الكاربوهيدرات . ان وجود او إطعام هذه العوامل يؤدي الى استعادة فلورا البكتريا المنشطرة وتساعدها على استعمار الأمعاء .

ت- اللاكتوفيرين Lactoferrin مركب بروتيني يحمل ثلاث معادن هي الحديد والنحاس والزنك وله تأثير محفز للنمو لعدد من انواع البكتريا المنشطرة سواء المعزولة من البشر او الحيوان وخاصة في الطور اللوغارتمي (Log phase) من اطوار نمو البكتريا .

بيئة البكتريا المنشطرة

البيئات التي تقطنها البكتريا المنشطرة محدودة ، هناك انواع عزلت من الانسان ومنها *Bif. bifidum* , *Bif. longum* , *Bif. infantis, Bif. breve* , *Bif. adolescentis* , *Bif. anagulatum, Bif. catenulatum* , *Bif. pseudocatenulatum* , *Bif. dentium* .

وقد ذكر في مستهل الموضوع ان الولادة الطبيعية والرضاعة الطبيعية تشجع هذه البكتريا على استعمار أمعاء الطفل وذلك تحت تأثيرات منها ان طبيعة تركيب حليب الام يؤثر على توازن فلورا الامعاء . وحتى الحليب المقلد لحليب الأم والذي له المواصفات الحيوية لحليب الأم من حيث ارتفاع تركيز اللاكتوز واحتوائه على اللاكتوفيرين واللاكتولوز Lactulose وتراكيز واطئة من البروتينات التي تستخدم من قبل بكتريا التعفن ، اضافة الى قابليته الدارئة الواطئة فهو غير قادر على توفير الظروف الملائمة للبكتريا المنشطرة كما هو الحال في الرضاعة الطبيعية . وقد وجد ان حليب الأم الطبيعي يحوي على بعض المركبات مثل Glynolactose وهي جريئة واطئة الوزن الجزيئي و Allolactose (β-D-galacropyranosyl- 1,6)-D-glycopranose)) . كما ان هناك مواد داخلية المنشأ وهي المواد الموجودة في القناة الهضمية وليست المواد الموجودة في الأغذية والتي تنتج من قبل المضيف وتستعمل من قبل البكتريا .

ويلاحظ بالاضافة الى طبيعة عملية الولادة فان وصول البكتريا المنشطرة الى بيئتها وهي امعاء الوليد يمكن ان تتأثر بالإجراءات الصحية الصارمة واستعمال المضادات الحيوية التي تؤدي الى تأخير عملية الوصول .

جدول 6 : مواصفات عوامل النمو الخاصة التي تحتاجها البكتريا المنشطرة

اسم العامل	البكتريا التي تحتاجه	المصدر	التركيب الفعال للعامل	المقاومة: الحرارة	المقاومة: الإشعاع
BB BF_1 BF_2	*Bif .bifidum* var **b** *Bif. bifidum* var **a**	حليب واللبأ ومتحللات كازين حليب الام والمواد المخاطية متحللات الكازين	بروتينات سكرية و N-acetylglucosamine بيبتيدات غير سكرية	+ +	+ +
Glycoproteins	*Bif .bifidum* var **a** *Bif .bifidum* var **b**	حليب الأم واللبأ	مادة سكرية		
B I	*Bif. infantis*	مستخلصات نباتية ومستخلصات الكبد، والحليب	مادة بروتينية	±	±
B L	*Bif. longum*	مستخلصات نباتية ومستخلصات الكبد، والحليب	مادة بروتينية	-	-

تصنيف البكتريا المنشطرة

البكتريا تحوي على نسبة عالية من GC تصل الى 57.2 - 64.5 % وهي لا تعود الى مجموعة بكتريا حامض اللاكتيك وانما تعود الى مجموعة الاكتينومايسيتات Actinomycetes ولكنها توضع مع بكتريا حامض اللاكتيك لانهم يشغلون القناة الهضمية للانسان والحيوان ، والمجموعتان ليس لهم علاقة مع بعض من الناحية التطورية . وتصنف اجناس وانواع البكتريا في المراحل الاولى من التصنيف المعتمد على الفحص الكيموحيوية والموضح بعضها لبعض الانواع في الجدول (7) .

جدول 7 : بعض الصفات الكيموحيوية لانواع البكتريا المنشطرة

تخمر السكريات																				
Salicin	Inulin	Mannitol	Melibiose	Trehalose	Maltose	Sucrose	Glactose	Fructose	Mannose	Xylose	Gluconate	Starch	Sorbitol,	Raffinose	Melezitose	Cellobiose	Lactate	L-arabinose	D-ribose	البكتريا
-	-	-	V	-	-	V	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	*Bif. bifidum*
-	-	-	+	-	+	+	+	+	V	V	-	-	-	+	+	-	+	+	+	*Bif. longum*
-	V	-	+	-	+	+	+	+	V	V	-	-	-	+	-	-	+	-	+	*Bif. infantis*
+	V	V	+	V	+	+	+	+	+	-	-	-	V	+	V	V	+	-	+	*Bif breve.*
+	V	V	+	V	+	+	+	+	V	+	+	+	V	+	+	+	+	+	+	*Bif adoles*

																				cenris.
+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	V	+	-	-	+	+	+	*Bif. angulatum*
+	V	V	+	V	+	+	+	+	-	+	V	-	+	+	-	+	+	+	+	*Bif. catenulatum*
+	-	-	+	V	+	+	+	+	+	+	V	+	V	+	-	V	+	+	+	*Bif. pseucatenulatum*
+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	*Bif. dentium*
-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	V	-	+	-	+	-	-	+	V	+	*Bif. globosum*
-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	V	V	V	+	+	*Bif. pe*

sudolongum																				
Bif. cuniculi	-	+	-	-	-	-	-	+	-		-	-	+	+	+	-	+	-	-	-
Bif. choerinum	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-
Bif. animalis	+	+	+	V	V	+	-	+	-	+	V	+	+	+	+	V	+	-	-	+
Bif. thermophilum	-	-	V	V	V	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	V	+	-	V	V
Bif. boum	-	-	V	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-
Bif. magnum	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+		+	-	-	-

+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	*Bif. pullorum*
-	-	-	+	-	+	+	+	V	V	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	*Bif. suis*
-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	*Bif. minimum*
V	V	-	+	V	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	*Bif. subtile*
+		-	+	-	+	+		+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	*Bif. coryneforme*
+	-	-	+	-	V	+	V	+	-	+	V	-	-	+	-	+	-	+	+	*Bif. asteroides*

Bif. Indicum	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	V	+	V	+	V	-	+	-	-	+

+ نتيجة موجبة

- نتيجة سالبة

V نتيجة متغايرة

والأجناس المذكورة في الجدول أعلاه يمكن ان تقسم الى مجاميع وفق مصدر عزلها . وتصنف افراد المجموعة وتشخص في الوقت الحاضر بالاعتماد على عدد من التقنيات ومنها :

1- إيجاد نسب GC في DNA .

2- أجراء تهجين الحوامض النووية DNA/DNA hybridization .

3- استعمال إنزيمات القطع لتحديد توالي القواعد النتروجينية في المواد الوراثية.

4- التحري عن البلازميدات .

ويلاحظ ان العديد من الدراسات أكدت على التحري عن البلازميدات وإيجاد النسق البلازميدي وذلك كما تم توضيحه من أهمية البلازميدات في حياة الخلايا وقد وجد مثلا ان *Bif. longum* التي تعد من الاحياء العلاجية المهمة تحوي على حوالي 13 بلازميد تتراوح أوزانها بين 1.25 -9.5 ميكادالتون (MDa) ، اما *Bif. globosum* فتحوي على بلازميدات تتراوح أوزانها بين 13.5 -46 ميكادالتون و *Bif. asteroids* فتحوي على 14 نوع من البلازميدات التي تتراوح أوزانها بين 1.2 -22 ميكادالتون والتي تختلف في تراكيبها وصفاتها . اما البكتريا *Bif. indicum* فان حوالي 60 % من السلالات تحوي على بلازميد واحد حجمه 22 ميكادالتون والبكتريا *Bif. breve* فان حوالي 40 % من سلالاتها تحوي على البلازميدات . وفي العديد من الحالات التي فحصت فأن هذه البلازميدات قد تمثل عاثيات معتدلة ولم تثبت أي علاقة بين البلازميدات وأي من الصفات العامة للخلايا عكس الحال بالنسبة لبكتريا حامض اللاكتيك .

المكورات المعوية

Enterococci

بعض انواع هذا الجنس يمكن ان تستعمل بصفتها احياء علاجية ومنها *Enterococcus faecium* و *E. faecalis* وبصورة عامة لا تعد هذه الاحياء من GRAS (Generally Regarded As Safe) وتشير التعليمات الصادرة عن اللجان التابعة لمنظمة الصحة العالمية WHO الى عدم الارتياح من استعمالها في العلاج ولكن بعض الأحيان قد تستعمل للضرورة .

وصفت البكتريا في اواخر القرن الثامن عشر (1899) ولكن وضعها في جنس خاص بها لم يتم الا في عام 1984 . يضم الجنس على ما يقرب 20 نوعا ، وتوصف بانها موجبة لصبغة كرام ، غير مكونة للابواغ ، لاهوائية اختيارية Facultative anaerobes وبذا فهي سالبة لفحص انزيم الكاتيلز . اشكالها كروية الى بيضوية تترتب بشكل مزدوجات Diplococci او بشكل سلاسل قصيرة . ولذا فالبكتريا لا يظهر فيها تغاير الأشكال كما هو الحال مع العصيات اللبنية والبكتريا المنشطرة .

تنمو البكتريا بتراكيز ملحية 6.5 % كلوريد الصوديوم وبحموضة تصل الى 9.6 . ويمكن للخلايا ان تقاوم درجة حرارة 60° م لمدة نصف ساعة ، وهذه الصفات تميزها عن المكورات الاخرى السالبة لفحص الكاتيلز . ومن الصفات الكيموحيوية الاخرى هو تخميرها لسكر الكلوكوز بطريق التخمر المتجانس بشكل اساسي ولكن في بعض الأوساط الغذائية يمكن ان تنتج حامض الفورميك اضافة الى حامض اللاكتيك . ونظرا للتغايرات التى يظهرها الجنس لذلك تستعمل الطرق الجزيئية للتصنيف والوصول الى النوع او السلالة .

الجنس ذو متطلبات غذائية كثيرة فهي تحتاج الى مجموعة فيتامينات B وبعض الحوامض الامينية والقواعد النتروجينية (بيرميدينات وبيورينات) للنمو الأمثل .

والسلالة 68 *E. faecium* (SF68) استعملت لمعالجة التهاب الامعاء الحاد واضطرابات الامعاء الاخرى . وتمتلك البكتريا عدة مواصفات (التي ستذكر لاحقا) تجعلها ملائمة للعمل أحياءا علاجية ومنها قصر وقت الجيل Generation time الذي يكون بحدود 20 دقيقة ، وتكون ثابتة في الارقام الهيدروجينية الحامضية حتى اكثر من *Lb. acidophilus* ولها فعالية مضادة تجاه الممرضات المعوية Enteropathgens .

الفصل الرابع

الاحياء العلاجية ومواصفاتها

الأحياء العلاجية ومواصفاتها

بعد نشر العديد من البحوث الموثقة تقبلت منظمة الصحة العالمية WHO ومنظمة الأغذية والزراعة FAO فكرة الأحياء العلاجية وأصدرت اللجان التابعة لها عام 2001 تعريفا للأحياء العلاجية والذي أرفق بعدة شروط لاعتبار الأحياء علاجية بعضها ذكر في مستهل الموضوع والأخر سيتم تناوله في الفصول القادمة عند مناقشة التشريعات الخاصة .

وتوجد العديد من الأحياء العلاجية الموثقة ومأمونة الاستعمال التي تسوق بشكل مجفد Lyophilized ومنها المذكورة في الجدول (8)

وقد كانت الأحياء العلاجية مادة لعشرات ومئات الدراسات إذ ازداد عدد الدراسات(المنشورة فقط) في الخمس سنوات التي سبقت عام 2003 الى 1000 بحث مقابل 85 دراسة وبحث أجريت في الربع قرن الذي قبلها . وهذا يشير الى فعالية هذا المجال الواعد . وقد لوحظ ان الأدلة السريرية التي تشير الى فوائد ملموسة في تصاعد ولكن هذا لم ينعكس على التوجه التجاري . وضمن الإحصائيات التي جرت وجد ان 76 % من الأطباء يتقبلون إدخال الأحياء العلاجية ضمن العلاجات التي يستعملونها . أما الأطباء غير التقليديين والعشابون منهم يستعملون الأحياء العلاجية الحاوية على العصيات اللبنية او البكتريا المنشطرة وأحياء أخرى دون تردد .

ويقع استعمال الأحياء العلاجية ضمن ما يسمى بالطب غير التقليدي Nontraditional medicine اوالطب البديل Alternative medicine اوالمكمل Complementary medicine والحقيقة ان هناك العديد من الأسباب التي دعت للبحث عن الأدوية والطب البديل للأغراض العلاجية ومنها المضادات الحيوية ومن هذه الاسباب :

1- زيادة مقاومة الأحياء المرضية للعديد من الأدوية وخاصة المقاومة المتعددة Multidrug resistance في المستشفيات وهذا ادى الى زيادة الطلب على المواد البديلة الطبيعية للأدوية.

2- ظهور أدلة علمية كثيرة على كفاءة الاحياء العلاجية في التأثير.

3- استرجاع تاريخ الممارسات القديمة للطب الشعبي والممارسات والعادات التي تجري في المجتمعات البدائية والتي أنتجت تراث زاخرا بناءا على التجربة والخطأ وان كان دون الاعتماد على أسس علمية مدروسة .

والأحياء العلاجية المسوقة تشمل أنواعا من جنس العصيات وأنواعا من البكتريا المنشطرة وأنواعا من المكورات المعوية ، وقد تكون ضمن أغذية علاجية معينة . وتستعمل لمضايف وأغراض مختلفة وقد وضعت لها مواصفات عدة منها :

جدول (8) الأحياء العلاجية المستعملة

العصيات اللبنية	البكتريا المنشطرة	المكورات المعوية	احياء أخرى
Lb .acidophilus	*Bif. bifidum*	*Ent. faecium*	*Saccharomyces boulardii*
Lb. plantarum	*Bif. infantis*	*Ent. faecalis*	*Lactococcus lactis* ssp *cremoris*
Lb. casei	*Bif. adolescentis*		*Lactococcus lactis* ssp *lactis*
Lb. rhamnosus	*Bif. longum*		*Leuconostoc mesenteroides*
Lb .delbrueckii ssp *bulgaricus*	*Bif. breve*		*Propionibacterium freudenreichii*
Lb. fermentum	*Bif. lactis*		*Pediococcus acidilactici*
Lb. johnsonii			*Streptococcus salivarius* ssp *thermophilus*
Lb. gasserii			*Escherichia coli*
Lb. salivarius			*Bacillus cereus*
Lb .reuteri			*B. subtilis*
			Asperigllus oryzae
			Oxalobacter formigenes

- ان تكون قادرة على البقاء عند عبورها الفم والمعدة والأمعاء الدقيقة والغليظة وعليه فأنها يجب ان تكون مقاومة لحموضة المعدة وكذلك تكون مقاومة لأملاح وحوامض الصفراء الموجودة في الجزء العلوي من الأمعاء .

- ان تكون قادرة على الالتصاق الى الخلايا المخاطية والطلائية المبطنة للأمعاء والنمو في ظروف الأمعاء أي تكون كفوءة في استعمار الأمعاء وطرد الأحياء الأخرى .
- قادرة على إفراز المواد المضادة للميكروبات لغرض التنافس مع الأحياء المرضية .
- قادرة على مقاومة مضادات الميكروبات التي تضاف كمواد حافظة للأغذية والعلف او التي تستعمل في العلاج .
- ان تكون قادرة على استهلاك المواد الغذائية بسرعة كي تتنافس مع الأحياء الأخرى مثل استهلاك الكلوكوز والحوامض الامينية وغيرها .
- تساعد المضيف في عمليات الايض مثل أنتاج أنزيم اللاكتيز Lactase لتساعد في هضم اللاكتوز وكذلك تقليل أنتاج الأمونيا والأمينات والإنزيمات المؤدية لها بتخفيضها لفعالية الأحياء المحللة للبروتينات .
- ان تساعد في تحسين وظيفة جدران القناة الهضمية .
- تحسين أداء الجهاز المناعي لجسم المضيف مثل زيادة أنتاج الأجسام المضادة او زيادة فعالية الخلايا المناعية مثل عمليات الابتلاع وتسميم الخلايا الورمية وغيرها مما سيرد ذكره .

وهناك عدة آليات يمكن للأحياء العلاجية التأثير بها على المضيف لإضفاء التغيرات الايجابية . وقد تمتلك السلالة الواحدة أكثر من آلية للتأثير وبعض الآليات قد تكون غير معروفة والذي توصلت له معظم الدراسات ان لم تكن كلها ان التأثير يكون معتمدا على السلالة بالدرجة الرئيسة . ومن الآليات المقترحة والتي يمكن ان تضم تفاصيل أكثر الأتي :

محـــاور التـــأثير

المحور الأول : كبح البكتريا الضارة والفيروسات والممرضات الأخرى

المحور الثاني :تحفيز الجهاز المناعي .

المحور الثالث : تغير نمط الفعاليات الحيوية في القناة الهضمية نتيجة لتغير فلورا الأمعاء

ويمكن تناول هذه الخطوط العريضة بشيء من التفصيل .

المحور الأول : وهو كبح الممرضات وهذا بدوره يعود الى عدة قابليات منها:

1- أنتاج مواد مضادة للأحياء الممرضة .

2- التنافس على مواقع الالتصاق .

3- التنافس على المغذيات .

4- تشجيع أنتاج المخاط في الأمعاء .

أولا : المواد المضادة للميكروبات Antimicrobial substances

تنتج بكتريا حامض اللاكتيك بعض المواد القاتلة للميكروبات مؤدية الى حفظ البيئة التي حولها بشكل ملائم لها لذلك استعملت للأغراض العلاجية وكذلك في حفظ الأغذية Biopreservation ومن ضمن القابليات هو أنتاجها للمواد القاتلة التي يمكن ان تكون ذات طبيعة ببتيدية او غير ببتيدية .

المواد غير الببتيدية : وتضم هذه المجموعة :

1- الحوامض العضوية ومنها حامض ألخليك Acetic acid (*p*Ka=4.75) وحامض اللاكتيك Lactic acid (*p*Ka=3.08) ، ويكون حامض ألخليك أكثر فعالية من ناحية تثبيط الأحياء الأخرى . وإنتاج الحامضان يؤديان بطبيعة الحال الى خفض الأرقام الهيدروجينية .

وقد وجد ان حامض ألخليك المنتج من البكتريا *Leuconostoc citrovorum* يثبط بكتريا *Salmonella* النامية معها ، إضافة الى ان المكورات اللبنية تثبط العنقوديات الذهبية *Staph.aureus* بنسبة تصل الى 98.1 - 98.9 % . وقد نشطت دراسات في جامعة بغداد والجامعات العراقية الأخرى في هذا المجال ، ففي عام 1988 وفي دراسة معتمدة وجد ان العصيات اللبنية المعزولة من أطفال رضاعة طبيعية أدت الى تثبيط العديد من سلالات *E. coli* ، *Salmonella typhimurium* ، *Shigella* المعزولة من اسهالات الأطفال ، وكانت السلالات الممرضة مقاومة للعديد من المضادات الحيوية لعلاج الإسهال وقد وصلت نسبة التثبيط للنمو المشترك للأحياء الى 97 - 99.8 % وقد اعزي جزء من هذه الفعاليات الى أنتاج الحوامض العضوية .

وفي هذا المجال أي الاعتماد على أنتاج الحوامض تقوم عملية Wisconsin process التي تستعمل فيها بكتريا *Pediococcus acidilactici* مع الدكستروز (D-glucose) لمنع تكون السم الوشيقي Botulinum toxin في الدواجن ، والعملية تعتمد على انه عندما تكون درجات الحضن غير ملائمة لحفظ لحوم الدواجن (أي بارتفاع درجة الحرارة) تنشط البكتريا وتخمر السكر منتجة الحامض وخفض الرقم الهيدروجيني الذي يمنع تكون السموم ، وتستعمل الطريقة للغرض نفسه في اللحوم .

إضافة الى أنتاج الحوامض الدهنية الطيارة الأخرى Short- chain fatty acids (SCFA) التي تساعد كثيرا في حركة الأمعاء الدودية .

2- أنتاج مركبات النكهة ومنها الاستالديهايد Acetaldehyde وهو مركب النكهة الأساسي في الحليب المتخمر Yoghurt او ما يسمى باللبن الرائب وفي العراق يطلق عليه الروبة ، وللمركب فعالية تثبيطية تجاه العديد من الأحياء الضارة والذي قد يساهم في حفظ اللبن الرائب لمدة أطول من الحليب الذي أنتج منه .

أما المركب المهم الأخر فهو ثنائي الاستيل Diacetyl (2,3-butanedione) ينتج من السترات والذي يعطي الزبد المنضج النكهة المرغوبة . وله تأثير مثبط لعديد من الأحياء فهو يثبط الخمائر والبكتريا السالبة لصبغة كرام بتركيز 200 مايكروغرام/ مللتر ، أما البكتريا الموجبة لصبغة كرام فتحتاج الى تراكيز أعلى تصل الى 300 مايكروغرام / مللتر، وتحتاج بكتريا حامض اللاكتيك الى حوالي 350 مايكروغرام / مللتر . وفي برنامج الجامعات العراقية حول تأثير ثنائي الاستيل (وخاصة جامعة بغداد) فقد وجد ان المركب يؤثر على البكتريا المحللة للدهون Lipolytic bacteria الملوثة للزبد بتراكيز تصل الى4 مايكرو غرام / مللتر وهو التركيز المسموح به في الزبد المنضج كما ان البكتريا المنتجة له *Streptococcus diacetylactis* (التسمية القديمة) قد أدت الى القضاء على أكثر من 95 % من البكتريا المحللة للدهون مثل *Pseudomonas aeruginosa* عند النمو في وسط مشترك . وضمن المجال ذاته استعمل المركب في محاولة القضاء على الأحياء الملوثة للمستشفيات بكافة مرافقها ، فقد كان المركب فعال بشكل كبير جدا ضد العديد من الأجناس التي كانت السمة العامة لها هي المقاومة المتعددة للمضادات وقد وصلت مقاومة بعضها الى (12) مضاد حيوي ، كما ان البعض منها وخاصة عزلات *Pseudomonas* تقاوم المطهرات Disinfectants والمعقمات المستعملة ولكن ما يعوق استعماله هو الحاجة إليه بتراكيز أكثر من 100 مايكروغرام / مللتر والذي يرافقه ظهور رائحة نفاذة تسبب الصداع لدى الأشخاص الحساسين . ومن الجدير بالذكر ان التراكيز التي استعملت لم تؤثر في اغلب الخمائر خاصة *Candida* .

3- أنتاج بيرو كسيد الهيدروجين وتنتجه العديد من بكتريا حامض اللاكتيك وخاصة العصيات اللبنية (يراجع فصل الايض) أثناء نموها ويؤدي الى منع العديد من الأحياء التي لا تملك نظام تفكيكه وهو أنزيم الكاتليز مثل بعض سلالات العنقوديات الذهبية وبعض سلالات *Pseudomonas* .

وللبيروكسيد علاقة بـ Lactoperoxidase system (LPS) الموجود في الحليب بتركيز 10- 30 مايكروغرام / مللتر . ولأجل ان يكون النظام فعالا وللبيروكسيد تأثيرا فان نظام (LPS) يحتاج الى وجود بعض المواد في الوسط الغذائي(المتمثل بالحليب) فهو يتفاعل مع اثنين من مواد الأساس وهي بيرو كسيد الهيدروجين وThiocyanate (SCN^-) . والاخيرة

منتشرة في إفرازات الأحياء وتوجد في الحليب بمعدلات 1- 10 جزء من مليون (ppm) ، اما البيروكسيد فينتج في الحليب بتأثير بكتريا حامض اللاكتيك حتى عند درجات حرارية واطئة ، ويمكن للبيروكسيد ان يتفاعل مع الثايوسينات بتأثير النظام الانزيمي (LPS) ليعطي نواتج أكسدة مثل Hypothiocyanate التي تثبط الأحياء المجهرية .

وتوجد بعض سلالات العصيات اللبنية ذات قابلية مضادة للأكسدة Antioxidative مثل البكتريا *Lb. fermentum* ME3 التي عزلت من أمعاء طفل سليم عام 2002 ، والبكتريا تنتج كميات كبيرة من انزيم Mn - Superoxide dismutase (Mn - SOD) أي الحاوي على المنغنيز وفعاليته تتراوح بين 0.309-0.860 وحدة/ ملغم بروتين ، إضافة الى انتاجها الكلوتاثايون المختزل بتركيز 9.95 مايكروغرام / مللتر من الوسط الغذائي ، ولها قابلية اكتساح جذور OH^- بنسبة 75% . وتنتج ايضا بيروكسيد الهيدروجين بكمية تصل الى 31 مايكروغرام / مللتر . والبكتريا لها فعالية مضادة للاكسدة كلية تصل الى 29 % .

والاحياء المضادة للاكسدة مثل البكتريا المذكورة اعلاه وكذلك البكتريا *Lb. rahmnosus* السلالة GG تستطيع ان تقلل من خطر تراكم مركبات الأوكسجين الفعالة Reactive oxygen species (ROS) ولذلك فهي تستطيع ان تقلل من الاجهاد التأكسدي Oxidative stress . كما ان السلالة ME3 لها فعالية عالية مضادة Antitherogenic activity كما اتضح عند تناولها من قبل متبرعين لحليب ماعز مخمر بالسلالة . كما اظهر السلالة فعلها المضاد للأكسدة في الفئران التي أعطيت غذاء ينقصه فيتامين E .

والسلالة ME3 لها فعالية مضادة للعديد من البكتريا السالبة لصبغة كرام مثل *E. coli* , و*Shigella sonnei* , *Sal. typhimurium* وكذلك تؤثر في *Staph. aureus* ، ومن جهة ثانية فهي لا تؤثر في بكتريا حامض اللاكتيك المستعملة كبوادئ في تصنيع الاجبان ، اضافة الى انها تستطيع العيش والتكاثر بدرجات حرارة واطئة لذلك تكون ملائمة جدا لإنضاج الجبن بدرجات حرارة واطئة ولذا تستعمل في أنتاج الاجبان العلاجية(يراجع فصل المنتجات العلاجية)
.

المواد الببتيدية :

ومن أهم هذه المواد هي البكتريوسينات وهي مجموعة غير متجانسة من المواد لها تأثير مضاد للميكروبات وتعد أمينة الاستعمال في حفظ الأغذية ، وقد عرفت عام 1976 على إنها " مواد بروتينية او ببتيدية تظهر فعل قاتل للبكتريا Bactericidal للبكتريا الحساسة لها" . وقد كانت التعاريف الأولى تشير الى أنها تؤثر في الأحياء والسلالات القريبة منها من حيث التصنيف والموجودة في بيئتها . ولكن وجد فيما بعد ان البكتريوسينات يمكن ان تؤثر على أحياء أخرى غير البكتريا مثل الفطريات . وعدم التجانس المذكور أعلاه يشمل جوانب عدة منها البكتريا المنتجة لها وطريقة تأثيرها على الأحياء الحساسة ، وكذلك صفاتها الكيماوية والفيزياوية وهي تتباين من حيث الوزن الجزيئي وتستعمل في التصنيف وتنميط السلالات Typing وتشابه البكتريوسينات الكوليسين Colicin من حيث القتل والبكتريا المنتجة للبكتريوسينات تحمي نفسها بالتعبير عن بروتين خاص الذي يكون في اوبرون البكتريوسين الذي ينظم أنتاجها . والبروتين الحامي يشكل نظام مكون من ثلاثة بروتينات ثانوية درس في النايسين (كما سيأتي ذكره لاحقا) .

وبكتريوسينات بكتريا حامض اللاكتيك تقع ضمن مجاميع معينة هي :

1- الصنف الاول Class I وهي ببيتيدات صغيرة اقل من 5 كيلودالتون(kDa) وتؤثر في الأغشية الخلوية مثل Lantibiotics وتحوي على الحامض الاميني غير الطبيعي Lanthionine . تعاني من تغييرات كثيرة بعد الترجمة خلافا للبكتريوسينات الاخرى التي تعاني في معظم الأحيان تكوين جسور ببتيدية فقط ، وتكون ثابتة تجاه الحرارة .

2- الصنف الثاني ClassII بكتريوسينات لا تحوي على الحامض الاميني Lanthionine وتعرف بـ Non-lantibiotics ، أوزانها تصل الى حوالي 10 كيلودالتون وتؤثر في الأغشية، ثابتة تجاه الحرارة وهي أكثر البكتريوسينات التي تم دراستها وتوصيفها ومنها IIa مضاد للبكتريا *L. momnocytogenes* (Anti-listerial agent) ، و II b مكون من اثنين من الببيتيدات وغيرها مثل (Sec- dependent bacteriocin) .

3- الصنف الثالث Class III بكتريوسينات كبيرة تكون غير ثابتة تجاه الحرارة .

4- الصنف الرابع Class IV مجموعة معقدة من البكتريوسينات وفيها ترتبط الدهون او الكاربوهيدرات الى الجزء ألبروتيني وتكون أساسية لفعالية البكتريوسين وهي كارهة للماء نسبيا وثابتة تجاه الحرارة .

والبكتريوسينات بطبيعتها البروتينية الكلية او الجزئية تكون حساسة للبروتيزات . وتخلق في البداية على شكل Preprobacteriocin تحوي النهاية الامينية N- terminal على

سلسلة قائدة تحوي جريئتين من الكلايسين Double- glycine leader peptide . وقد وجد ان الجينات المسؤولة عن أنتاجها وكذلك المناعة ضدها في الأحياء المنتجة (بكتريا حامض اللاكتيك) على وجه الخصوص توجد على البلازميدات مما يعني أنها مرشحة للفقد من قبل الخلية تحت ظروف خاصة .

وتتأثر عملية أنتاج البكتريوسينات بالوسط المحيط في حالة دراستها خارج الأنظمة الحية و قد وجد ان وسط Rogosa medium يشجع أنتاج البكتريوسينات ذات الأوزان الجزيئية العالية الحاوية الدهون وذلك لان الوسط يحوي على تراكيز عالية من المواد البروتينية . وقد أشارت الدراسات التي أجريت في جامعة بغداد/ كلية الزراعة الى ان وسط MRS (de Mann Rogosa Sharp medium) الذي يستعمل لتنمية بكتريا حامض اللاكتيك وخاصة العصيات اللبنية له قابلية عالية لتشجيع أنتاج البكتريوسينات التي تؤثر في العديد من البكتريا المرضية المعوية المسببة لإسهال الأطفال والمقاومة للعديد من المضادات الحيوية .

وآلية التأثير لاكثر البكتريوسينات انها تعمل على عدم ثباتية الأغشية الخلوية وتغير نضوحيتها بتكوين معقدات او قنوات أيونية بارتباطها الى جزيئات مستلمة مثل المواد الدهنية Lipid II او بروتينات PTS وتؤدي الى تشتت وعدم تكون القوة الدافعة للبروتونات .

وتقاس فعالية البكتريوسينات بعدة طرق التي تهدف الى إيضاح تأثيرها وأبعاد تداخلها مع مواد أخرى ، وأفضل وسيلة هي طريقة لانتشار في الاكر Agar diffusion method والتي تجري بتحويرات كثيرة مثل استعمال أوساط مختلفة وإعداد خلايا مختلفة من السلالات الحساسة أو الدالة Indicator strains ، وكذلك استعمال طرق مختلفة لإضافة البكتريوسين الى نظام الكشف عنه ، كما يستعمل Mitomycin C كمادة لتحفيز أنتاج البكتريوسين وان كان المعتقد انه يساعد فقط في الإفراز خارج الخلايا دون التأثير على عمليات التخليق .

وتنتج العديد من العصيات اللبنية والمكورات اللبنية بكتريوسينات كثيرة ،والحقيقة ان باقي أجناس بكتريا حامض اللاكتيك تنتج البكتريوسينات وقد وصل ما مكتشف منها العشرات بل المئات وهي في تزايد مستمر . وقد حظيت البكتريوسينات المنتجة من قبل المكورات اللبنية بدراسات مستفيضة نظرا لأهميتها الصناعية على وجه الخصوص . وقد اكتشف النايسين عام 1928 وبدأت تطبيقاته الواقعية في الخمسينات وفيما يلي ملخص عن بعض البكتريوسينات المهمة والتي تجد لها تطبيقات عملية .

بكتريوسينات المكورات اللبنية :

النايسين Nisin

يعد مضاد حيوي بروتيني او بيبتدي صغير وينتج من المكورات اللبنية *Lc. lactis* وحظي البكتريوسين بدراسات مفصلة ووجد ان هناك أنواع منه هي E,D,C,B,A وأكثرهم فعالية هو النوع A وهو يوجد بشكل تركيب مزدوج Dimer ذو وزن جزيئي 7000 كيلودالتون يحوي على الكبريت بنسبة 5.6 % يؤثر في البكتريا الموجبة لصبغة كرام وخاصة في الابواغ (Sporicidal) مثل ابواغ البكتريا *Clostridium botulinum* لذلك كان ملائما في حفظ الأغذية وخاصة المعلبة او التي تحضر باستعمال الحرارة ، وهو يمنع عملية إنبات البوغ . والفعالية الأخرى المهمة هو تأثيره في البكتريا المرضية الخطرة *L. monocytogenes* .

ودرست النواحي الوراثية له في السلالة *Lc.lactis* 6F3 ووجد ان مجمع الجينات المسئولة عن النايسين يقع على قطعة مكونة من 15 كيلو قاعدة وتوجد بالترتيب

nis G, *nis* E, *nis* F, *nis* K ,*nis* R ,*nis* P , *nis* I , *nis* T , *nis* C , *nis* B , *nis* A

فالجين *nis* A يشفر لبيبتيد النايسين الذي يكون بشكل Prepeptide مكون من 57 حامض اميني ، تنشطر بتاثير منتجات *nis* P لتعطي بيتيد مكون من 34 حامض اميني وتحدث له تحويرات بعد الترجمة من تاثير الجينات *nis* C , *nis* B لإعطاء البيبتيد الناضج وإفرازه يكون تحت تاثر الجين *nis* T .

والنا يسين عندما يؤثر يكون ثقوب Voltage – dependent pores تؤدي الى اضطراب جهد الأكسدة والاختزال وتشتيت القوة الدافعة للبروتونات عبر الاغشية الخلوية .

اما الجينات الاخرى *nis* I *nis* G, *nis* E, *nis* F فهي مسئولة عن المناعة ضده في الخلايا المنتجة ، والجينات *nis* K , *nis* R مسئولة تنظيم عمليات انتاجه ، فالـ R هو المسئول عن الاستجابة التنظيمية Response regulator ، اما K فهو Histidine kinase.

والطبيعة التركيبية للنايسين هي سلسلة ببتيدية موجبة الشحنة Cationic polypeptide ولذلك تعمل كمنظف فعال للسطوح Surface –active cationic detergent ويمكن ان تتعادل فعاليته مع الصوابين السالبة Anionic soaps . وأول خطوات تأثيره هو امتزازه على سطوح الخلايا الحساسة ثم يؤثر على الغشاء الخلوي مؤديا الى أحداث اضطراب وخروج المواد السايتوبلازمية . أما في الابواغ فيقوم بالمنافسة على الأنزيمات الحاوية على السلفاهيدريل Sulfhydryl وذلك لأنه عند عملية الإنبات تكون الأغشية الخلوية قد دمرت ولا وجود لها . وعند استعماله بتراكيز عالية فانه يمنع تخليق المكوثر ألجداري البيبتيدوكلايكان ولم تسجل له أي سمية وقد سمحت الجهات المختصة (WHO/FAO) باستعماله بمستوى من التناول اليومي

المقبول Acceptable daily intake (ADI) بمدى يتراوح بين صفر -33000 وحدة عالمية / كغم من وزن الجسم / يوم .

Diplococcin : اكتشف إنتاجه من المكورات اللبنية عام 1933 وينتج من عدد من سلالات *Lc. lactis* ssp *cremoris* وهو لا يحوي على الحوامض الامينية الحاوية على الكبريت . ويؤثر في البكتريا القريبة *Lc. lactis* ssp *lactis* . ونظرا لكونه يؤثر في الخلايا الحساسة في الطور أللوغاريتمي او ألتزايدي من أطوار نمو البكتريا لذلك يعتقد انه يؤثر في العمليات الخاصة بتخليق الحوامض النووية (RNA, DNA) في الخلايا الحية ، أذ تسبب إضافته توقف مباشر لعملية تخليق هذه الحوامض في السلالات الحساسة ولكنه لا يؤدي الى تحلل الخلايا . وهو غير فعال تجاه البكتريا المكونة للابواغ . والبكتريوسين غير ثابت تجاه الإنزيمات المحللة للبروتينات مثل التربسين Trypsin و Pronase و α-chymotrypsin خاصة عندما يكون بشكل نقي . والجينات المسؤولة عن تخليقه بلازميدية ووجد ان البلازميد المسؤول هو بلازميد اقتراني ووزنه الجزيئي 54 كيلودالتون .

Lactostrepcins : تنتج من البكتريا *Lc. lactis* ssp *cremoris* من سلالات غير منتجة للنايسين ومجال تأثيرها واسع وتؤثر في بعض العصيات اللبنية و Leuconostocs ، واعتمادا على تأثيرها على الاحياء الاخرى قسمت الى خمسة انواع ، ويختلف إنتاجها اعتمادا على السلالة ومرحلة النمو وتحوي على حوامض طبيعية ولا تحوي على الدهون واوزنها ألجزيئية تتراوح بين 600 - 20000 وعادة تقاوم درجة حرارة 100 ْم لمدة 10 دقائق . البكتريوسينات حساسة للإنزيمات المؤثرة في البروتينات ، ووجد ان إنتاجها مرتبط بالبلازميدات .

مستلماته تقع على الجدران الخلوية ولذلك تمتز عندها ثم يؤثر على الأغشية الخلوية مؤديا الى تدميرها واطلاق ATP وايونات البوتاسيوم من داخل الخلية ، وتأثيراتها الأخرى انها تؤدي الى إيقاف تخليق كل من RNA و DNA والبروتينات .

بكتريوسينات Leuconostocs : ينتج الجنس عدد من البكتريوسينات التي تؤثر على بعض افراد بكتريا حامض اللاكتيك الأخرى . ولكن الأغلبية العظمى من بكتريوسينات هذا الجنس تؤثر على البكتريا *Listeria* ولذلك تستعمل في حفظ الأغذية سواء باضافة البكتريوسين او البكتريا المنتجة وخاصة اللحوم المخمرة ، ومنها :

Mesentericin Y105 ينتج من البكتريا *Le. mesenteroides* ssp *mesenteroides* ويؤثر بقوة في البكتريا *L . monocytogenes* .

Leucocin A- UAL 187 : وتنتجه البكتريا *Le. gelidum* .

Carnosin 44A : وينتج من البكتريا *Le. carnosum*.

Leuconocin S: وينتج من البكتريا *Le.paramesenteroides* .

وتوجد بكتريوسينات كثيرة اخرى تنتج من انواع الجنس اكثرها تستعمل في صناعة اللحوم المخمرة .

وتنتج المكورات الاخرى من بكتريا حامض اللاكتيك عددا كبيرا من البكتريوسينات او مشبهاتها فمثلا Pediococcin الذي يوجد منه ACH وA1 وPediococcin A تنتج من انواع مختلفة من جنس *Pediococcus* .

بكتريوسينات العصيات اللبنية

معظم البكتريوسينات التي تنتجها تكون غير مرتبطة بوجود البلازميدات ، كما ان مداها في التأثير يكون ضيقا ، ولكنها تنتج مواد شبيه بالبكتريوسينات Bacteriocin-like substances يكون مدى تأثيرها واسعا يمتد من بكتريا موجبة لصبغة كرام او سالبة لصبغة كرام وغيرها ومنها بشكل مختصر المنتجة من البكتريات الآتية :

Lb. helveticus :

Lactocin-27 وهو من البكتريوسينات المعقدة أذ يحوي بالإضافة الى الشطر ألبروتيني او البيبتيدي على الكاربوهيدرات أي انه من البروتينات السكرية Glycoproteins وله وزن جزيئي 12400 تنتجه السلالة LP27 *Lb. helveticus* وكذلك بعض سلالات البكتريا *Lb. fermenti* ونظرا لطبيعته البروتينية يكون البكتريوسين حساس لبعض البروتيزات .

والبكتريوسين يمكن ان يوقف نمو سلالات اخرى من البكتريا *Lb. helveticus* وكذلك يؤثر في البكتريا *Lb. acidophilus* ، وتأثيره يكون على عمليات تخليق RNA او DNA ولا يؤثر على مستوى ATP في الخلية .

Helveticin S : وينتج من بعض سلالات *Lb. helveticus* ذو طبيعة بروتينية لذا يكون حساس لبعض البروتيزات ، ويثبط بدرجة 100 ْم لمدة 30 دقيقة . يقتل سلالات معينة من *Lb. helveticus* وكذلك *Lb. bulgaricus* و *Lb. lactis* ولا يؤثر في *L. monocytogenes* وتكون الجينات المسؤولة عن انتاجه كروموسومية .

بكتريا *Lb. bulgaricus* :

Bulgarican : من المواد واطئة الوزن الجزيئي غير البروتينية تنتجه *Lb. bulgaricus* وله مدى واسع من التأثير من البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام مثل *Ps. aeuroginosa, Ps. fluorescence, Staph aureus Serratia*.

marcescens, E. coli , Bacillus subtilis , Proteus vulgaris , Sarcina lutea ولا يؤثر في الفطريات .

بكتريا *Lb. acidophilus* :

Lactocidin : ينتج من بعض سلالات البكتريا وهو ذو تأثير واسع المدى ويتآزر في تأثيره مع بيروكسيد الهيدروجين والحوامض العضوية والمواد المشابه للمضادات الحيوية .

Lactacin B : مادة قاتلة تنتجها بعض سلالات البكتريا *Lb. acidophilus* اضافة الى إنتاجها *Acidophilin , Acidolin* ، والمادة مقاومة للحرارة حساسة لبعض البروتيزات ، ووزنها ألجزئيي 6200 دالتون ويمكن ان تتجمع الجزيئات مع بعضها البعض لتعطي وزن جزيئي يقرب من مئة ألف دالتون . أهمية المادة تكمن في أنها مثبطة لبكتريا *L. monocytogenes* أي تكون Anti-listeric agent وهي لا تؤثر في ابواغ البكتريا *Cl. botulinum* .الجينات المسؤولة عنها كروموسومية ، اما مواقع امتزازها على سطوح خلايا الأحياء فهي غير متميزة ويمكن ان تمتز على سطوح الخلايا الحساسة وغير الحساسة .

Lactacin F : بكتريوسين نتيجة بعض سلالات *Lb. acidophilus* ايضا ، له وزن جزيئي 2500 يتكون من 56 حامض أميني ، مقاوم للحرارة حساس لبعض البروتيزات ، ويعتمد أنتاجه من السلالات على الرقم الهيدروجيني للوسط الذي توجد فيه . يؤثر على انواع اخرى من الجنس نفسه *Lactobacillus* وكذلك في بعض السلالات *Ent. faecalis* التي تستعمل كأحياء علاجية والمهم فيه ان يؤثر في البكتريا *L. monocytogenes* . والجينات المسؤولة عن أنتاجه وكذلك المناعة ضده هي جينات بلازميدية .

***Lb. casei* :**

من اهم سلالاتها المستعملة في العلاج على نطاق واسع هي **GG** *Lb. casei* والتي تذكر في بعض المراجع بالاسم **GG** *Lb. casei rhamnosus* ومن المواد التي تنتجها مادة لها وزن جزيئي اقل من 1000 وهي مادة مقاومة للهضم بالبروتيزات ولها تاثير واسع فمن البكتريا السالبة لصبغة كرام التي تتاثر بها هي *E. coli* *Pseudomonas* ، *Salmonella* أما الموجبة لصبغة كرام فهي تؤثر في *Bacillus* ، *Clostridium* ، *Streptococcus* وتؤثر كذلك في البكتريا المنشطرة *Bifidobacterium* ، ووصفت المادة بأنها ليست في البكتريوسينات وإنما تشابه Microcin الذي تنتجه العائلة المعوية Enterobacteriaceae .

***Lb. reuteri* :**

Reuterin : مثال اخرعلى المواد واطئة الوزن الجزيئي غير البروتينية وهو 3-hydroxypropionaldehyde ينتج من ازالة جزيئة ماء من الكليسرول ينتج من

البكتريا متباينة التخمر *Lb. reuteri* (يراجع موضوع الايض) وله تأثير واسع جدا ويشمل البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام والخمائر والفطريات والابتدائيات Protozoa . فهو يثبط من البكتريا السالبة *Salmonella* ، *Shigella* و Coliform . اما البكتريا الموجبة لصبغة كرام فهو يثبط *Clostridium* ، *Staphylococcus* ، *Listeria* ومن الخمائر يثبط خميرة *Candida* والابتدائيات *Trypanosoma* .

ومن التطبيقات البيطرية في العراق استعمال بكتريا *Lb. reuteri* في الفرشة تحت الدواجن لغرض منع او تقليل إصابات الجهاز التنفسي في الطيور وذلك لان هذه البكتريا تمنع دورة انتقال البكتريا المسببة وهي بعض سلالات *E. coli* من الفضلات الى الطريق التنفسي وكانت النتائج جيدة في هذا المجال .

***Lb. plantarum* :**

Lactolin : ينتج من البكتريا *Lb. plantarum* المهمة في تخمير الخضر ويؤثر في البكتريا *Staph.aureus* وكذلك يؤثر في الخلايا منزوعة الجدران (الجبيلات) من البكتريا السالبة لصبغة كرام . والبكتريوسين معقد بروتيني كبير يصل وزنه الجزيئي الى حوالي 100,000 ، ويثبط بالبروتيزات والحرارة ويعتقد انه يشابه النايسين في تثبيطه لبعض سلالات *Cl. botulinum*

Plantaricin A : يفرز من قبل بعض سلالات *Lb. plantarum* وله وزن جزيئي 8000 دالتون يؤثر في عدد من سلالات بكتريا حامض اللاكتيك ويكون قاتلا لها . ولا يؤثر في البكتريا الخطرة *L. monocytogenes* او الاحياء المرضية الاخرى .

***Lb. sakei* :**

Sakacin A : ينتج من بعض سلالات *Lb. sakei* و *Lb. plantarum* ، *Lb. curvatus* ، يثبط العصيات اللبنية الاخرى .ويؤثر في انواع البكتريا الخطرة مثل *L .monocytogenes* ، *L. ivanovii* ، *L. innocua* ولكنه لا يؤثر في *Cl. botulinum* لايؤثر في البكتريا السالبة لصبغة كرام مثل *Sal. typhimurium* و *Sal. anatum* وكذلك في العديد من سلالات *Yerssina enterocolitica* و *E. coli* و *Aeromononas hydrophila* . تخليقه مرتبط بالبلازميدات .

Lactocin S : ينتج من سلالات *Lb. sakei* وهو بكتريوسين حساس للبروتيزات ولكنه مقاوم نوعا ما للحرارة . ويؤثر في بعض انواع جنس العصيات اللبنية *Lactobacillus* وكذلك المكورات من بكتريا حامض اللاكتيك مثل Leuconostocs و Pediococ*ci* والجينات المسؤولة عن تخليقه والمناعة ضده هي بلازميدية .

تنظيم انتاج البكتريوسينات :

ويقع تنظيم انتاج البكتريوسينات في العديد من السلالات تحت تأثير كثافة الخلايا أي تحسس الزحام Quorum sensing الذي يتم التحسس به بإفراز بيبتيدات فرمونية Peptide pheromones ، والتحسس يكون لنمو الاحياء القريبة منها في البيئة المحيطة مما يؤدي الى فتح عملية انتاج البكتريوسينات اذ يكون التنافس على الغذاء وغيره من العوامل على أشدها .

ونتيجة للمنافسة يلاحظ ان الخلايا التي تنتج بكتريوسينات ذات مدى ضيق التاثير فانها تعوض بانتاج عددا كبيرا ومن مختلف الأصناف ولها قابليات تثبيطية مختلفة وهذا يعني عدم حصول المقاومة في الاحياء المستهدفة وبالتالي غلبة بكتريا حامض اللاكتيك في البيئة التي تشغلها .

ثانيا - المنافسة على الالتصاق مع الأحياء الأخرى

من أهم مواصفات الأحياء العلاجية هو قابليتها للالتصاق في الأماكن التي تستهدفها وهي عادة القناة الهضمية او القناة التناسلية (في الإناث) وبهذه القابلية يمكن ان تنافس الأحياء الأخرى وكذلك أظهار فعلها في الجهاز المناعي او غيرها من الفعاليات . وعملية الالتصاق عادة عملية متخصصة جدا تحدث بين العوامل اللاصقة على سطح الأحياء العلاجية ومستلماتها على خلايا المضيف والتي تكون في اغلب الأحياء الخلايا الطلائية Epithelial cells ، ولذلك ولتجاوز عرقلة عملية الالتصاق نصت التعليمات الخاصة بصفات الأحياء العلاجية ان تكون معزولة من الإنسان (في حالة العلاج البشري) ، واستبعدت الى حد ما السلالات المستعملة للأغراض الصناعية لتوفير الفرصة لعملية الالتصاق ، إضافة الى أمكانية تحملها من قبل الجهاز المناعي وعدم رفضها .

وتقاس عملية التصاق الأحياء العلاجية خارج الجسم الحي باستعمال خط الخلايا البشرية Caco-2 ، والجدول (9) يوضح بعض درجات التصاق الأحياء العلاجية .

ان الأحياء العلاجية المشتقة او المعزولة من الإنسان لها علاقة خاصة مع المكان الموجودة فيه فهي تكون قادرة على الالتصاق واستعمار او استيطان المكان مثل الامعاء وليس مثل الاحياء المرضية التي تعتمد على قابلية الغزو Invasion . وبعد عملية الالتصاق يكون نجاح الاحياء العلاجية مرهونا بـ :

1- قابليتها على التكاثر في الموقع الذي وجدت فيه وهذا يعتمد على وجود مواد اساس تساعد في نموها (كما سيأتي ذكره لاحقا) وقابليتها على خلق ظروف أكسدة واختزال ملائمة لنموها .

2- ان تكون عملية الالتصاق الى الخلايا او المواد المخاطية قوية لتصبح بعيدة عن عمليات الجرف والإقصاء .

آليات الالتصاق

هناك العديد من التفسيرات لهذه الظاهرة التي تستطيع بواسطتها البكتريا استيطان الأمعاء فعند الالتصاق وجد ان هناك فجوة تصل الى 40 نانومتر مملوءة بالمواد الليفية توجد بين البكتريا والخلية الملتصقة بها والبكتريا مطوقة بالغشاء الخلوي بشكل كامل او بشكل جزئي ، وبعض الاحيان يتم الارتباط دون حصول عملية اختراق البكتريا للخلايا التي تلتصق بها .

وتتأثر عملية الالتصاق بعدة عوامل كما ان هناك بعض المقومات التي تتم بواسطتها ومنها .

1 - اللاصقات Adhesins : وهي تراكيب تلعب دورا مهما في عملية الارتباط او الالتصاق ويوجد نوعين منها :

- النوع ألبروتيني وهي تراكيب بروتينية خارجية لغشاء الخلية خاصة مثل الشعيرات او الخمل Pili او fimbriae في البكتريا السالبة لصبغة كرام . والشعيرات يمكن ان ترتبط الى

جدول (9) درجات التصاق بعض الأحياء العلاجية الى خط الخلايا البشرية Caco-2

سلالة الاختبار	درجة الالتصاق
***Lactobacillus* GG** **السلالة الأصلية**	**+++**
(1)*Lactobacillus* GG	**++**
***Lactobacillus* GG lot 3689**	**+++**
***Lactobacillus* GG lot 950719**	**+++**
***Lactobacillus* GG lot 1490**	**+++(+)**
***Lactobacillus* GG lot 1690**	**++++**
***Lactobacillus* GG lot 1790**	**+++(+)**
***Lactobacillus* GG lot 4788**	**++(+)**
***Lactobacillus* GG lot 1789**	**+++**
(2)*Lactobacillus* GG col 1	**+++**
(2)*Lactobacillus* GG col 2	**+++**
(2)*Lactobacillus* GG col 3	**+++**
Lactobacillus bulgaricus	**–**

Lactobacillus acidophilus	**—**
***Bifidobacterium* 12-1**	**— ، (+)**
***Bifidobacterium*2572**	**— ، (+)**
***Bifidobacterium*2919**	**— ، (+)**
***Bifidobacterium*2394**	**— ، (+)**
***E.coli* (B44)**	**—**

GG منتوج شرش مخمر Gefilus/ Gefilac

(1) السلالة الأصلية بعد مرور 3- 5 سنوات من النقل في وسط MRS

(2) سلالات معزولة من أشخاص يتناولون منتوج Gefilus/Gefilac (GG)

ــ لا يوجد التصاق

+ التصاق بسيط ، ++ التصاق متوسط القوة ، +++ التصاق جيد ، ++++ التصاق جيد جدا

البروتينات السكرية او الدهون السكرية الموجودة في الاغشية الخلوية للعديد من خلايا الفقريات . وقد تكون هذه التراكيب المخملية مرتبطة بأجسام أطلق عليها اجسام الخمل Fimbriosomes وهي تراكيب مدورة وجدت في بعض الطفرات التي لها علاقة بالخمل ولها قابلية عالية على الالتصاق

النوع غير ألبروتيني وهي تراكيب مكونة من السكريات المكوثرة للعلب (Capsules) او المواد المخاطية خارج الخلية البكتيرية يمكن ان تساهم في التصاق البكتريا الى الخلايا الطلائية للفائفي ومنها LTA(Lipoteichoic acid) في البكتريا الموجبة لصبغة كرام الذي له ألفة عالية للارتباط مع اغشية الخلايا الطلائية للبائن ويحدث الارتباط بواسطة الجزء الدهني للـ LTA وتكوين روابط استرية .

وضمن ظاهرة الالتصاق يظهر ما يسمى بتغاير الطور Phase variation والتي تساعد البكتريا على تحوير سطوحها لزيادة قابليتها على الالتصاق كما يحصل في *E. coli* وكذلك البكتريا المنشطرة وتحدث هذه سواء داخل او خارج الأنظمة الحية .

2 - **مستلمات الالتصاق Adhesion receptors** : ومن أهمها البروتينات والبروتينات السكرية على سطوح خلايا المضيف وكذلك هناك مواقع ارتباط للحوامض الدهنية . فمثلا *E. coli* ترتبط الى الخلايا الطلائية في الجهاز البولي او بخلايا القولون المعزولة بواسطة الدهون السكرية التي تشكل حوالي 20 % من دهون الأغشية للخلايا المعوية . وهذه الدهون السكرية تحوي على ثمالات من Gal β gal a 1-4 الموزعة بشكل عشوائي والتي يمكن الارتباط بها . ويتم الارتباط

أيضا بواسطة المستلمات الحساسة للمانوز وهي تمثل أحدى البروتينات السكرية العديدة ، وتقوم هذه المستلمات باقتناص البكتريا الموجودة في الإفرازات المخاطية .

ان وجود المستلمات على سطوح الخلايا يتأثر بمدى نضوج الخلايا وعمر المضيف وكذلك جزء الامعاء المعني بالالتصاق ، وبطبيعة الحال تكون الخلايا المعوية Enterocytes في البالغين ناضجة وغير ناضجة في الاطفال ، وهذا ما يؤدي الى اختلاف فلورا الامعاء (كما ذكر انفا) ، ولذا فان اختلاف وتغاير المستلمات ووظيفتها له تاثير على نوع الفلورا . ومن جهة ثانية يكون التغاير سببه الجوانب الوراثية اذ ان المستلمات وخاصة الدهون السكرية تحدد وراثيا .

وقد أشارت العديد من الدراسات الى ان بعض الانواع البكتيرية يمكن ان تحور مواقع المستلمات على الخلايا الطلائية وبالتالي تؤدي الى تثبيط التصاق البكتريا التي تستعملها والذي يتوقع ان يحصل من قبل الاحياء المستوطنة للأمعاء .

التصاق البكتريا المنشطرة

لا يخفى ما لهذه البكتريا من أهمية كبيرة في الأطفال وكذلك كأحياء علاجية . ويعتقد ان LTA (Lipoteichoic acid) له دخل في عملية الالتصاق مثل باقي البكتريا الموجبة لصبغة كرام . وفي عملية الالتصاق تصبح الخلايا سالبة الصبغة أي يحصل فيها تغاير الطور المذكور أعلاه . وقد وجد ان عملية التصاق البكتريا المنشطرة تكون قوية وذلك لان التداخل الكاره للماء يكون أكثر نظرا لوجود نسبة عالية من الحوامض الدهنية في المستلمات على سطوح الخلايا المعوية والقولونية وكثرة LTA ، وهذا يؤدي الى زيادة كراهية الماء Hydrophobicity لهذه البكتريا ، كما ان الشحنات الكهربائية المستقرة القوية في السكريات المكوثرة في البكتريا الموجبة لصبغة كرام تساعد وتشجع عملية الالتصاق وبالنسبة للبكتريا المنشطرة فان الالتصاق الى الخلايا الطلائية يؤدي الى خلق بيئة ملائمة لنمو البكتريا بغض النظر عن تقلب البيئات . وكفاءة البكتريا المنشطرة للالتصاق تشارك فيها جوانب اخرى وهي قابلية البكتريا على تحليل وتفكيك المواقع الخاصة بارتباط الاحياء المرضية وسمومها بافراز الانزيمات ومنها Glycosidases التي تدمر المستلمات في الخلايا والمخاط وبذلك تمنع ارتباط البكتريا إليها وربما فسر هذا شيوعها في الأطفال إضافة الى درجة نضج الخلايا المذكورة اعلاه . وعندما تستقر البكتريا المنشطرة في البيئة المعوية تبدأ بإنتاج مواد الايض التي لها تأثير على البكتريا الاخرى وكذلك المضيف ولها وظيفة دفاعية تجاه الاحياء الممرضة .

ثالثا - المخاط Mucus

وهي المواد التي تغطي الطبقة الطلائية ويطلق عليها الطبقة المخاطية للقناة الهضمية وتبدأ من المعدة الى القولون . ويتكون المخاط من هلام مطاط ولزج ذو وظيفة وقائية ، وتركيبه الكيماوي هو بروتينات سكرية ويشارك في المساعدة في عملية التصاق الخلايا للأمعاء كما أشارت دراسات

المجهر الالكتروني وهو من ناحية أخرى يوفر الحماية ضد اختراق البكتريا الممرضة ، كما انه يسهل طرد الاحياء الضارة الى خارج الجسم .

ونظرا لعدم إمكانية التأكد من التصاق الاحياء العلاجية الى الخلايا الطلائية للأمعاء داخل الجسم الحي يوصى بإعطاء الاحياء العلاجية بشكل مستمر وبقدر الحاجة .

المحور الثاني : ويتضمن التأثير على الجهاز المناعي لجسم المضيف

خلايا جسم المضيف من النوع حقيقة النواة ولذلك سيتم استعراض بعض الجوانب المتعلقة بهذا الموضوع .

الخلايا حقيقة النواة

للاحياء العلاجية تاثير كبير على تحفيز الجهاز المناعي وقد تم ملاحظة العلاقة القوية للمناعة مع البكتريا المنشطرة وبقية بكتريا حامض اللاكتيك من مطلع العشرينات للقرن الماضي ، ولغرض فهم تاثير الاحياء العلاجية على الجهاز المناعي والإمراض المتعلقة به مثل السرطان لابد من وقفة موجزة عند الجهاز المناعي وذلك لان موضوع المناعة بحر لا ساحل له وسيكتفي بالجوانب ذات العلاقة ، اضافة لدراسة مبسطة لدورة حياة Eukaryotic cell cycle بقدر تعلق الموضوع ، وذلك لان اغلب الجوانب المناعية تتم بواسطة الخلايا .

دورة حياة الخلايا حقيقية النواة :

دورة حياة الخلايا حقيقية النواة تكون متشابه بشكل أساسي في اغلب الاحياء لذلك فدراسة بعضها يمكن ان يؤدي الى فهم الدورة . وتمر الخلية اثناء دورتها Cell cycle بأربع أطوار رئيسة يكون نمو الخلايا فيها مستمرا ألا ان تخليق DNA يحصل في مدة محدودة ثم توزع المادة النووية قبل الانقسام النهائي للخلية لإعطاء خليتين . وتطور عمليات الانقسام وانتقال الخلايا من مرحلة او طور الى أخر يقع تحت سيطرة صارمة من أجهزة التنظيم التي تقوم بتنظيم الإحداث المختلفة اضافة الى ربط الخلايا بالإشارات الخارجية التي تؤثر على السيطرة وعلى تكاثر الخلايا ، وأي خلل في تنظيم دورة الخلية والإخلال بنقاط السيطرة Check points فيها يؤدي الى عدم ثبات جينوم الخلية وتتوفر عندها عوامل الاستعداد للسرطان ولذلك فان فهم دورة حياة الخلية يكون مهما من الناحية العلمية والطبية .

أطوار دورة الخلية : في مزارع الخلايا البشرية التي تتم دورة الخلية فيها في مدة 24 ساعة يلاحظ ان الدورة تنقسم الى قسمين رئيسية هي :

-1 الانقسام الخيطي Mitosis .

-2 الطور البيني Interphase .

ويمثل الانقسام الخيطي (انقسام النواة) الجزء الأهم من دورة الخلية وبعده تتوزع المادة الوراثية على نواتين يليها انقسام السايتوبلازم Cytokinesis وينتهي الانقسام الخيطي للنواة وانقسام السايتوبلازم في حوالي مدة ساعة اما الباقي الذي يمثل اكثر من 95% من دورة الانقسام فيشغلها الطور البيني الذي يمثل الطور بين انقسامين .

وأثناء الطور البيني تقل كثافة الكروموسومات وتتوزع في النواة التي تبدو متجانسة ، وعلى المستوى الجزيئي فانه اثناء هذا الطور يتضاعف DNA ومكونات السايتوبلازم بشكل مرتب ومتتالي استعدادا لدورة انقسام جديدة ، اذ يكون النمو معتدلا الى ان يتضاعف حجم الخلية ولذلك فان توقيت تضاعف DNA يقسم الدورة الى أربعة ادوار او مراحل مميزة يختلف طولها بشكل كبير في الانواع المختلفة من الخلايا وهي :

M phase (Mitosis) : ويعني الانقسام الخيطي الذي يعقبه انقسام السايتوبلازم ويمتد لمدة حوالي ساعة في الخلايا البشرية سريعة الانقسام والتي يكون زمن دورتها 24 ساعة .

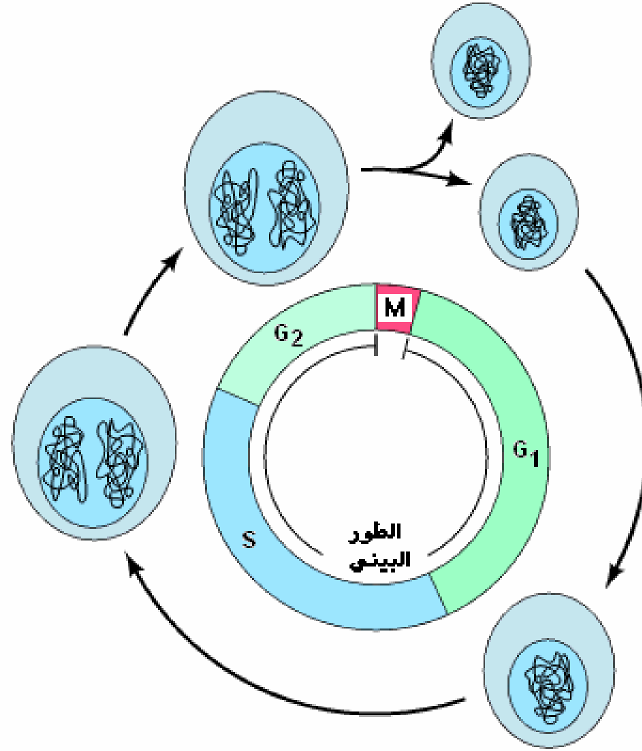
G1 (Gap1) : وتعني المرحلة الأولى وتمثل المدة بين الانقسام الخيطي وبدا تخليق DNA وتستمر حوالي 11 ساعة (لخلايا تنقسم في 24 ساعة) والخلايا في هذه المرحلة تكون نشطة من الناحية الايضية وفي حالة نمو مستمر ولكن لا يوجد تضاعف للـ DNA .

S phase (Synthesis) : وفيه يحدث تخليق وتضاعف DNA ويلي المرحلة السابقة ويطول الطور او المرحلة الى حوالي 8 ساعات .

G2 (Gap 2) : المرحلة التي تلي تخليق وتضاعف DNA وتطول حوالي 4 ساعات ، وتستمر فيها الخلايا بالنمو وتخليق البروتينات استعدادا للانقسام الخيطي .

والأطوار موضحة في الشكل (12)

وتختلف الخلايا في سرعة النمو وطول دورة الخلية فمثلا في الخمائر المتبرعمة تستمر دورة الخلية الى حوالي 90 دقيقة تقريبا . وفي بعض الأحيان الى 30 دقيقة كما في الخلايا الجنينية بعد التخصيب مباشرة ، اذ ان مثل هذه الخلايا لا تحتاج الى نمو اذ ينقسم سايتوبلازم البيضة الى خلايا صغيرة ويلاحظ اختفاء كل من مرحلة G2,G1 ولكن يحدث تضاعف سريع للـ DNA وبذلك يكون S قصير ويتبادل مع M . وعلى النقيض فان بعض خلايا الانسان او الحيوان البالغ مثل الخلايا العصبية تتوقف عن الانقسام ، وانواع اخرى تنقسم في مراحل معينة او في حالات معينة عندما يراد تعويض الخلايا المتضررة او الميتة او عندما تحفز بعض الخلايا مثل الخلايا المناعية بإشارات من خارج الخلية .



شكل 12 : أطوار دورة الخلايا الحقيقية النواة

والخلايا عند توقفها عن الانقسام فإنها تخرج من مرحلة G1 لتدخل مرحلة G_0 اذ تكون الخلايا نشطة من الناحية الايضية ولكن لا تتكاثر الا اذا استدعت الضرورة بواسطة إشارات تأتي من خارج الخلية .

والخلايا في المراحل اعلاه يمكن ان تميز بطرق معينة ، فالخلايا المنقسمة يمكن ان تميز بالمجهر ، اما الاطوار الاخرى فتميز باستعمال مؤشرات كيموحيوية . ففي طور تخليق DNA (S) يمكن متابعتها بتسجيل كمية ما يدمج من الثايميدين المعلم او المشع Radioactive thymidine الذي يستعمل بشكل أساسي في تخليق DNA .

كما يمكن تمييز الخلايا من محتواها من DNA :

- فالخلايا في G1 تكون مزدوجة الكروموسومات Diploid (ضعفاني) اي يوجد نسختين من كل كروموسوم (2n) (n تمثل محتوى DNA في الحالة الفردانية Haploid للجينوم)
- الخلايا في مرحلة S يزداد فيها DNA وتصل الى 4n أي ان المحتوى يتراوح بين 2n ← 4n .
- اما الخلايا في طور G2 فيبقى DNA بمستوى 4n .
- والخلايا في طور M يتناقص DNA الى 2n بعد انقسام السايتوبلازم .

تنظيم دورة الخلية

ان استمرار الخلية في الانقسام ينظم بواسطة إشارات من خارج الخلية أي من البيئة وكذلك باشارات داخلية . والانقسام الناجح يعتمد على التأكيد على ان المواد الخلوية قد تم مضاعفتها وتوزيعها على الخلايا البنوية بشكل متناسق . والتناسق هذا يمكن الوصول اليه بوضع أحداث الدورة تحت السيطرة ، وعمليات السيطرة تتم بواسطة نوع من انزيمات كاينيزات البروتين Protein kinases وتعرف Cyclin –dependent kinases (CdKs) وذلك لانها تنشط او تثبط بواسطة بروتينات تدعى المدورات Cyclins التي تختلف مستوياتها أثناء دورة الانقسام ويمكن ان تفكك في مراحل معينة وتعود او تخلق بالتعبير عن جيناتها الخاصة لذلك سميت بالمدورات لان وجودها يكون بشكل دوري . وعمليات التنظيم بخطوط عريضة تشمل .

1 - تنشيط CdKs ويكون ذلك بالتعبير عن وحدات المدورات Cyclin subunits
2 - ان فعالية واحد من CdKs تكون لازمة لتنشيط ما بعدها في السلسلة .
3 - يتم تدمير المدورات بعد أداء مهمتها ضمانا لحدوث الدورة باتجاه واحد .
4 - عند الظروف غير الملائمة يمنع تجمع المعقدات من Cdk - cyclins لتأخير وإبطاء الدورة ويكون ذلك اما بالفسفرة او بالارتباط الى بروتينات مثبطة .

نقاط السيطرة Check points

الخلايا في حالة عدم الانقسام تكون في المرحلة G_0 ولكن عند استلامها للإشارات Signals الخارجية تدخل مرحلة G1 .

وتنظم الدورة بنقاط السيطرة (كما ذكر اعلاه) واهم هذه النقاط هي الواقعة في نهاية G1 والتي تسيطر على استمرار الخلايا من G1 الى S وهذه اول ما شخصت في خميرة الخبز *Saccharomyces cerevisiae* وتعرف بـ START (البداية) وفي الخلايا الحيوانية تعرف بنقطة التقيد او السيطرة Restriction point (Rp) .

في الخميرة وعند عبور الخلايا نقطة البداية تنتقل الى طور التخليق S ثم تعاني من الانقسام ، وعبور النقطة يكون منظما بشكل دقيق في الخميرة والتي يسيطر عليها بإشارات خارجية مثل توفر المواد الغذائية وحجم الخلية . فاذا عانت الخميرة من نقص الغذاء فأنها تبقى عند نقطة البدء وتدخل حالة الهجوع او الراحة Resting state دون الدخول الى طور التخليق S ، ولذلك تكون هذه النقطة هي نقطة قرار بالنسبة للخلية ومستقبل الخلايا التي ستنتج من انقسامها . وعند النقطة يمكن ان تقف الخلايا ايضا بتأثير عوامل من ببتيدات متعددة التي تعطي الاشارة للتزاوج Mating للسماح لخلايا الخميرة الفردانية للالتحام مع بعضها بدلا من الاستمرار الى طور التخليق S .اضافة الى ذلك فان نقطة البدء تعمل كنقطة قرار لتسجيل الاشارات من خارج الخلايا ، فهي النقطة التي يحصل

عندها تنسيق نمو الخلية مع تضاعف DNA في الخلية المتبرعمة والتي تؤدي الى انتاج خليتين الكبيرة هي الخلية الام والصغيرة (البرعم) هي الخلية البنوية . والخلية الصغيرة يجب ان تنمو الى حجم الام قبل ان تبدأ بالانقسام لذلك وجب مراقبة حجم الخلية ليتلاءم مع أحداث الدورة الأخرى وهذا يعني ان الخلايا البنوية يجب ان تنمو الى الحد الأدنى او الحد الحرج من الحجم قبل ان تعبر نقطة البدء ولذا فأن الخلايا الصغيرة تقضي وقت طويل في مرحلة G1 وتنمو بشكل اكبر من الخلية الام .

اما النمو في الخلايا الحيوانية فأنه ينظم بشكل مشابه في G1 من دورة الخلية وبشكل خاص في نقطة القرار الأخيرة في G1 وهي Rp المذكورة اعلاه ، ونقطة التقييد تعمل بشكل مشابه لنقطة البدء في الخمائر ، والشكل (13) يوضح نقطة التقييد في دورة حياة الخلية الحيوانية .

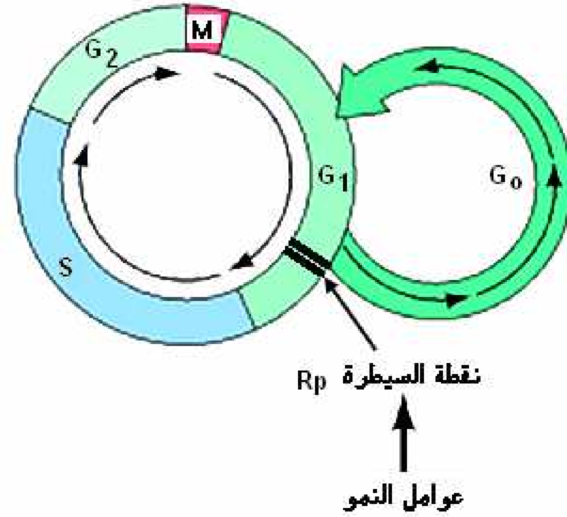
ومرور الخلايا الحيوانية خلال الدورة ينظم بشكل أساسي بعوامل النمو الخارجية التي تعطي الإشارة للتكاثر والانقسام وليس بوفرة المواد الغذائية كما هو الحال مع الخمائر .

فعند وجود عوامل نمو ملائمة وظروف ملائمة تعبر الخلايا Rp وتدخل طور التخليق S وبعد العبور تستمر الخلايا في باقي المراحل دون الحاجة الى عوامل النمو وتحفيزاتها . ومن جهة ثانية اذا لم توجد عوامل النمو الملائمة عند المرحلة G1 فتتوقف مسيرة الخلايا عند النقطة Rp وعندها تدخل الخلايا مرحلة السكون Go (الموضحة في الشكل أعلاه) ويمكن ان تبقى فيها مدة طويلة دون تكاثر.

وعندما تستأنف الخلايا دورتها عند توفر الظروف الملائمة او ورود إشارات لذلك ، فأن اول المدورات التي يتم تنشيطها هو Cyclin D وبتنشيطه يصبح قادرا على التجمع مع الكاينيزات الخاصة وهي CdK4 و CdK6 ليكون مركب معقد يدخل النواة ويقوم بفسفرة البروتين Retinoblastoma protein (Rb) والبروتينات المتعلقة او الملحقة به .

وفسفرة Rb تكون مهمة لتنشيط مجموعة من عوامل الانتساخ Transcription factors وهي مجموعة E_2F family وهذا يؤدي لإنتاج البروتينات اللازمة لكل مرحلة من G1 وطور التخليق S . ويلاحظ انه ولشدة السيطرة الصارمة لابد من ان تكون هناك عوامل تسير بالدورة الى الأمام ولكن في الوقت نفسه تحتاج الى كوابح للعديد من الخطوات لذلك فأن الاشارات المثيرة للانقسام والتي تسحب الخلايا من مرحلة الركود Go الى G1 تقوم بتحفيز Cyclin D كما ذكر انفا وتحفز Cyclin E واثنين من الكاينيزات المتعلقة به (CdKs) وهي P_{21}^{cip1} ، P_{27}^{kip1} وهذه تعمل مثبطات في مسارات خاصة ومنشطات في مسارات اخرى . فمن تأثيراتهم المنشطة يلاحظ انها ضرورية لتجمع Cyclin-CdK4 لتكوين المعقد الذي يدخل النواة ، أي انها لا تثبط فعالية الكاينيز، ولكن من جهة ثانية فأن البروتينان لهم تأثير مثبط للمعقد E-CdK2 . ومن هنا يتضح ان P_{27} ,

P_{21} يكونان ضروريان لتحفيز وتكوين D-CdK4 في بداية G1 . ويتضح ان فسفرة Rb وملحقاته تكون ضرورية لتنشيط انتساخ العوامل الضرورية لطور التخليق S .



شكل 13 : نقطة السيطرة Restriction point في الخلايا الحيوانية

وبعد عبور نقطة التقيد Rp يلاحظ ان النمو والتضاعف وانعزال الكروموسومات سوف يستمر دون الاعتماد على ورود اشارات خارجية .

وبعد مرحلة G1 تدخل الخلايا مرحلة تخليق DNA ويكون ذلك بتنشيط E-CdK2 الذي كان معطلا في G1 ، وتنشيطه يؤدي الى بدء التضاعف . وكما ذكر انفا ان تثبيط E-CdK2 كان تحت تاثير العوامل المثبطة مثل P_{27} لذلك يقوم E-CdK2 بفسفرة المثبط الذي يتحول الى شكل يمكن تمييزه بالأنزيم Ubiquitin ligase ويكون هدفا للتدمير من قبل جسيمات التحلل البروتيني Proteosomes وبذا يتخلص E-CdK2 من عامل السيطرة السالبة عليه . كما ان E-CdK2 يقوم بفسفرة المدور E مؤديا الى تدمير المدور وهذه الآلية او الصفات تجعل المثبط ووحدة المدور عرضة للتفكك أي ان معقدات الكاينيزات تكون منشطة ذاتيا Self-activating ومحددة ذاتيا Self- limiting . وبذا تكون عملية الفسفرة عاملة في الاتجاهين منشطة للتفاعل في بعض الأحيان ومثبطة للتفاعل في احيان اخرى .

التنظيم بين طوري G1 و S :

بعد انتهاء مرحلة G1 تدخل الخلية طور التخليق وعند هذه الحدود يتم تنشيط المدور Cyclin A ويتم التعبير عنه بعد التعبير عن E المذكور اعلاه . وعندها تكون الوحدات مرتبطة بالكاينيز الخاص بها فتتكون المعقدات E-CdK2 و A-CdK2 وهذه المعقدات تكون ضرورية لتضاعف DNA وإكماله وكذلك لضمان ان عملية التضاعف تحدث مرة واحدة كل دورة . فالمدور A

والكاينيز المرتبط إليه يحفز عمليات تنفيذ أحداث طور التخليق وذلك بزيادة انتاج الهستونات وتحفيز الجينات الاخرى اللازمة لإكمال التضاعف . وبعد تضاعف مكونات الخلية وتضاعف مادتها الوراثية تواجه الخلية عملية الانقسام الى خليتين بنوية وهذا يحصل بالانقسام الخيطي (النووي) الذي ينقسم الى عدة ادوار وهي بشكل مقتضب كالآتي :

1 - الطور التمهيدي Prophase وفيه تبدأ الكروموسومات بالتكثف وتكوين خيوط المغزل .

2 - طور التقابل Metaphase والطور يبدأ بطور تمهيدي لـه Prometaphase وفيه تتصل خيوط المغزل بالكروماتيدات الشقيقة بواسطة Kinetochores وبعدها يتكسر الغشاء النووي ويتم انتظام الكروموسومات وسط الخلية .

3 - طور الانفصال Anaphase ينفصل الجينوم المتضاعف ويسحب الى جهتي الخلية المتعاكسة

4 - الطور النهائي Telophase وفيه تقل كثافة الكروماتيدات ويبدأ الغلاف النووي بالتكون .

ثم تلي ذلك مرحلة الانقسام الخلوي او السايتوبلازمي Cytokinesis ويتم فصل السايتوبلازم وتكون خليتين جديدة .

والاحداث الاخيرة تتم بسيطرة CdK1 (Cdc 2) ومعاونة المدورات B,A وهذه تظهر في نهاية طور التخليق ويبقى مستواها مرتفعا أثناء طور G2 , M . ويتم توزيع العضيات Organelles على الخلايا الناتجة ، فالعضيات التي توجد منها عدة نسخ مثل المايتوكوندريا فهي توزع بالتساوي اما العضيات التي يوجد منها نسخة واحدة مثل أجسام كولجي Golgi apparatus فيجب ان تنقسم ثم توزع ، ويلعب في ذلكCdK1 المرتبط بالمدور B2 الموجود على سطح الشبكة الاندوبلازمية Endoplasmic reticulum دورا اساسيا في توزيع مكونات أجسام كولجي التي تستعمل في بناء أجسام كاملة جديدة .

ان المراحل المختلفة من الانقسام تتميز بكونها سريعة جدا ومتناسقة أذ تختفي المدورات وملحقاتها ، ويتم تدمير الملحقات الخاصة بطور الانقسام M وذلك لضمان عودة الخلايا الى الطور البيني قبل بدء دورة جديدة من تضاعف DNA والتي تبدأ بمساعدة Anaphase promoting complex (APC) وبروتينات مثبطة صغيرة يطلق عليها CkIs وتوجد منها مجموعتين :

- Ink_4 وتشمل مجموعة من البروتينات المثبطة وهي التي تثبط CdK6 , CdK 4 (المذكورة) ، ومن ارتباطها بـ CdK4 اشتق الاسم ، وتكون منطقة ارتباطها هي النقطة التي يرتبط بها المدور D وبذلك فهي يمكن ان تمنع الإحداث الأولى لدخول المعقدات الى النواة وما يليها من إحداث .

- المجموعة الثانية هي cip/kip وتشمل عدد كبير من البروتينات مثل , P_{21}^{cip1} , P_{27}^{kip1} , P_{27}^{kip2} وهذه ترتبط بقوة الى المعقدات الحاوية علىCdK 2 ، واول هذة العائلة هو P_{21} وهو ينظم بـ P_{53} استجابة لتدمير DNA .

اما الوجهة الثانية في التنظيم فهو تدمير المدورات والطريق الأساسي في ذلك استعمال طريق المدمر Ubiquitin لجعل الخلايا تتخلص من بروتينات الدورة التي أدت دورها ووظيفتها وبذلك تكون إحداث الدورة منظمة ولا تحدث بشكل غير ملائم . فإضافة ثمالة المدمر الى البروتين المراد تدميره هي بمثابة إشارة لتفكيكه بواسطة 26S proteosome وهو معقد مكون من عدة وحدات خلوية متخصصة لفتح الانطواءات وتحليل البروتينات المعلمة بالمدمر . وعمليات توجيه البروتينات لمسار التفكك تشمل مكونات خلوية اخرى لا مجال لذكرها بالتفصيل .

وضع الخلايا في مراحل الدورة المختلفة

تتوقف الخلايا عن الاستمرار بدورة الخلية عند المرحلة Go عند عدم ورود اشارات للانقسام والتي يمكن ان تبقى فيها الخلايا لمدة طويلة ، وتكون الخلايا فعالة من الناحية الايضية بالرغم من توقف النمو والانقسام ويكون معدل تخليق البروتينات فيها واطئا جدا، ويمكن ان تخرج من دور الركود لتدخل الى G1 عند ورود إشارات خارجية فمثلا خلايا الارومات الليفية الجلدية Skin fibroblasts تبقى في المرحلة Go الى ان تحفز للانقسام عند الحاجة لتصليح ضرر نتج من الجروح ويتم بدء او قدح هذه العملية بواسطة Platelet – derived growth factor الذي ينطلق من الصفائح الدموية أثناء تجلط الدم وإعطاء الإشارات لتكاثر الخلايا في المنطقة المحيطة بالأذى . وبالرغم من ان اغلب الخلايا تنظم تكاثرها عند G1 إلا ان بعض الخلايا تنظم دوراتها عند G2 فمثلا :

- في الخميرة *Schizosaccharomyces pombe* فهي تقف عند G2 على عكس الخميرة *Sc. cerevisiae* التي تتم فيها السيطرة على الانتقال من G2 الى M والتي يتم عندها تسجيل مؤشرات ضرورية مثل حجم الخلية وجاهزية المواد الغذائية .
- في الحيوانات فان Oocyte وخاصة في الفقريات يمكن ان تبقى الخلايا عند G2 لمدة طويلة مثل بقاءها عدة عقود في الانسان ، وانتقالها الى M يكون بتحفيز الهرمونات .

وفي اغلب الخلايا تكون الإشارات الخارجية هي التي تنظم استمرار مرور الخلايا من G2 الى M كما هو الحال في انتقال الخلايا من G1 الى S .

التنسيق بين العمليات في النواة والسايتوبلازم

من أوجه التناسق والسيطرة هو ان الخلية لا تبدأ بالانقسام الى ان يتم مضاعفة جينومها وإلا فأن البديل يكون أحداث مفجعة في انقسام الخلايا وذلك لان الخلايا البنوية تفشل في الحصول على

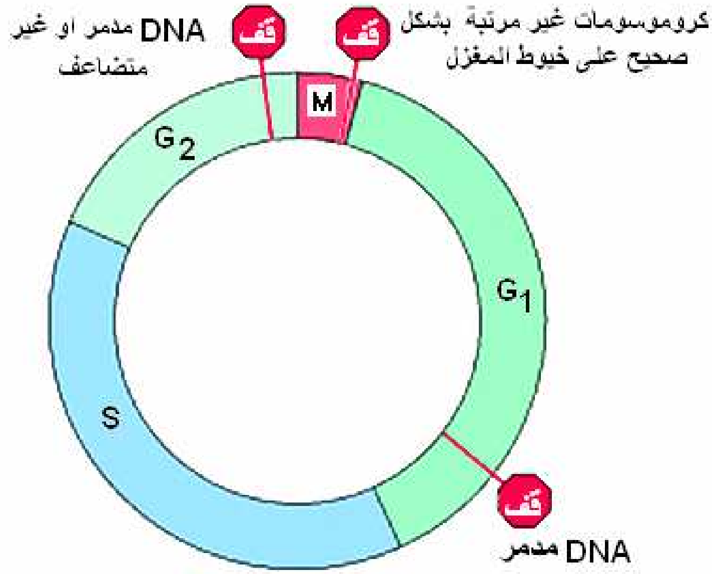
نسخ كاملة من المواد الوراثية لآبائها . وفي معظم الخلايا فان التنسيق بين الأطوار المختلفة يتم بواسطة نقاط السيطرة والسيطرة الرجعية Feedback control والتي يتم بواسطتها منع الخلية من الدخول الى طور ما لم تكمل أحداث الطور الذي قبله . فحدوث أي مشكلة في أي مسار من دورة الخلية يمكن ان يخلق إشارة لتوقف الدورة بكافة نواحيها وان لم تكن مرتبطة . ولذلك فأن نقاط السيطرة هي الآليات التي تتم بواسطتها السيطرة على التوقيت وترتيب الأحداث ولعل اللاعب الرئيس في عمليات التنسيق هي CdKs والمدورات والتي ترتبط بها التي تم استعراضها آنفا، فهي تنسق الفعاليات بواسطة التنشيط او التثبيط وكذلك زيادة الكميات او تفكيك هذه البروتينات اضافة الى عمليات الفسفرة التي تؤدي أكثر من غرض ، ولعل المهم بالنسبة لهذه المكونات المسيطرة هو تبادل مواقعها بين النواة والسايتوبلازم لغرض الفسفرة او فسفرة غيرها من المكونات والسماح للمنظمات بالتحرك في أقسام الخلية المختلفة وعملية تغيير المواقع هو مظهر عام للـ CdKs .

واهم الأحداث المؤذية التي تتعرض لها الخلايا هو إصابة مادتها الوراثية بالضرر وعندها ستتأخر دورة الخلية اما عند G1 او G2 الى حين إجراء عمليات الإصلاح والتي يعد المقياس الزمني لإصلاح DNA هو الأهم ويمكن ان تقسم عمليات الإصلاح الى :

- عمليات سريعة تستغرق دقائق وهي التي تقوم بها نقاط السيطرة بإجراء عمليات الفسفرة او التفكيك للمكونات المشمولة .
- عمليات طويلة الأمد تمتد بالمقياس الزمني الى ساعات وتعتمد على حث عمليات الانتساخ للبروتينات المثبطة العاملة في دورة الخلية وهذه تكون حرجة أذ تحتجز الخلية لمدة طويلة اذا كان الإصلاح ليس من النوع السهل .

وفي حالة الاستجابات السرعة يشترك P_{53} في التنظيم سواء كان بصورة مباشرة او غير مباشرة ، ففسفرة P_{53} يؤدي الى انتساخ عدة جينات منها المثبط P_{21} للـ CdK ، فحث المثبط هو الالية المهمة لحجز الدورة في G1 استجابة للضرر الذي يصيب DNA او اضطراب مجمع النيوكليتيدات Nucleotide pool . وإضافة لذلك فأن P_{53} يحفز انتساخ بروتينات أخرى مثل 3-14-3 و 36- 3- 14 اللازمة لبقاء الدورة في G2 لمدة طويلة والملاحظ ان P_{53} الذي يلعب دورا أساسيا في التنظيم يحفز بمكونات أخرى .

وعليه فان تضرر DNA او الأشرطة غير كاملة التضاعف تمنع استمرار دورة الخلية ويكون ذلك من نقطة السيطرة الموجودة في G2 والتي تمنع بدء الانقسام ما لم يتم تضاعف DNA وهي الموضحة في الشكل (14)



شكل 14 : نقاط السيطرة في دورة حياة الخلية

وهذه النقطة تتحسس بالـ DNA غير المتضاعف والذي يؤدي الى توليد إشارة تؤدي الى توقف الخلية ومنع بدء الانقسام . والإضرار المختلفة للـ DNA هي الناتجة من الإشعاع او المواد الكيماوية اوغيرها ، والتوقف هنا يسمح بعمليات الإصلاح بدلا من عبور مادة وراثية متضررة الى الخلايا البنوية . ولذلك فان الضرر لا يقتصر على هذه المرحلة وانما يسبب بطء في دور التخليق وكذلك يوقف تقدم الخلايا في نقطة السيطرة الموجودة في G1 لإجراء الإصلاحات قبل بدء عمليات تخليق وتضاعف DNA في طور S .

وكما ذكر اعلاه يلعب P_{53} دورا اساسيا في الاستجابة لحدوث الضرر في DNA وهو يعمل في G1 ، وفقد P_{53} لوظيفته نتيجة الطفرات يمنع الحجز والتوقف عند G1 عند وجود خلل في المادة الوراثية ولذلك يتضاعف DNA المتضرر ويمرر الى الخلايا البنوية بدلا من حصول إصلاحات عليه ، وتوريث DNA المتضرر يؤدي الى عدم ثباتية الجينوم الخلوي والذي يشارك في تطور السرطانات وقد وجد ان الطفرات في جين P_{53} هي الاكثر شيوعا في سرطانات الإنسان

اضافة الى ما ذكر اعلاه من نقاط السيطرة توجد نقاط اخرى مثل تلك التي تضمن اصطفاف الكروموسومات وسط الخلية على خيوط المغزل لتوزيعها بشكل متساوي .

والحقيقة ان عمليات وشبكات السيطرة في الخلية كثيرة ومتشابكة ولا يزال العديد من جوانبها غير مكتشف لحد الان ولكن ما قدم هو توضيح للخطوط العريضة وبقدر تعلق تاثير الاحياء العلاجية على الخلايا سواء كانت المناعية او الخلايا الطلائية في الأعضاء والأجهزة التي تستعمرها مثل القناة الهضمية والقناة التناسلية .

ولأهمية الجهاز المناعي وعلاقته الوثيقة بالأحياء العلاجية سيتم الطرق لهذا الجهاز بشكل مقتضب وبقدر تعلقه بموضوع الكتاب

الجهاز المناعي

شبكة من الخلايا والأنسجة والأعضاء ومكوناتها التي تعمل بشكل متضامن للدفاع عن الجسم من هجوم الغازيات الغريبة مثل الميكروبات بأنواعها وذلك لان جسم الانسان والحيوان تمثل بيئة مثالية لنموها لذا تحاول الدخول اليه . وعليه عندما يصاب الجهاز المناعي ويشل او يعطل فأن ذلك يؤدي الى سيل ووابل من الإمراض منها الحساسية والايذ والتهاب المفاصل Arthritis . والجهاز المناعي معقد جدا ، ويمكن ان يتذكر الملايين من المستضدات Antigens ويمكن ان ينتج العديد من المواد والخلايا للتخلص منها .

وتنتظم خلاياه في مجاميع ثانوية لتعطي المعلومات بشكل منتظم لعمله ، فعندما تستلم الخلايا الإنذار Alarm تعاني من تغيرات سريعة وذات معنى وتبدأ بإنتاج المواد الكيماوية الفعالة التي تسمح بتنظيم فعاليات النمو والتصرف للخلايا وتجندها ضد الخطر الداهم لمعالجته .

القابلية التميزية للجهاز المناعي

صحة الجهاز المناعي وسيره بالطريق السليم يعتمد على قابليته تمييز خلاياه بين جزيئات الجسم ذاته وبين الاجسام الغريبة . فالجهاز المناعي يتصرف ويتعايش مع الخلايا الحاملة للواسمات او الجزيئات الذاتية ولكن عندما يواجه اجسام غريبة فانه يحرك استجابات سريعة لمهاجمتها ، والمواد التي تحفز الاستجابة المناعية تسمى المستضدات Antigens والذي يمكن ان يكون ميكروبات او جزء منها او أنسجة او خلايا من شخص اخر التي تحمل واسمات غير ذاتية (Non-self) وهذا ما يوضح رفض الأنسجة والأعضاء . وفي بعض الاحيان يخطأ الجهاز المناعي ويهاجم أنسجته مؤديا الى امراض المناعة الذاتية Autoimmune diseases مثل السكري وبعض إمراض المفاصل ، وبعض الاحيان يتصرف تجاه الأجسام الغريبة غير المؤذية مثل حبوب اللقاح للنباتات وغيرها مؤديا الى الحساسية Allergy ومثل هذه المستضدات تسمى بالمحسسات Allergens .

مكونات الجهاز المناعي

تتوزع أعضاء الجهاز المناعي على الجسم وتتكون من :

- الأعضاء اللمفاوية Lymphoid organs وتسمى كذلك لأنها تأوي الخلايا اللمفاوية او اللمفاويات Lymphocytes وهي خلايا دم بيض تنتج في الأعضاء اللمفاوية وتعد اللاعب الرئيس في الجهاز المناعي .

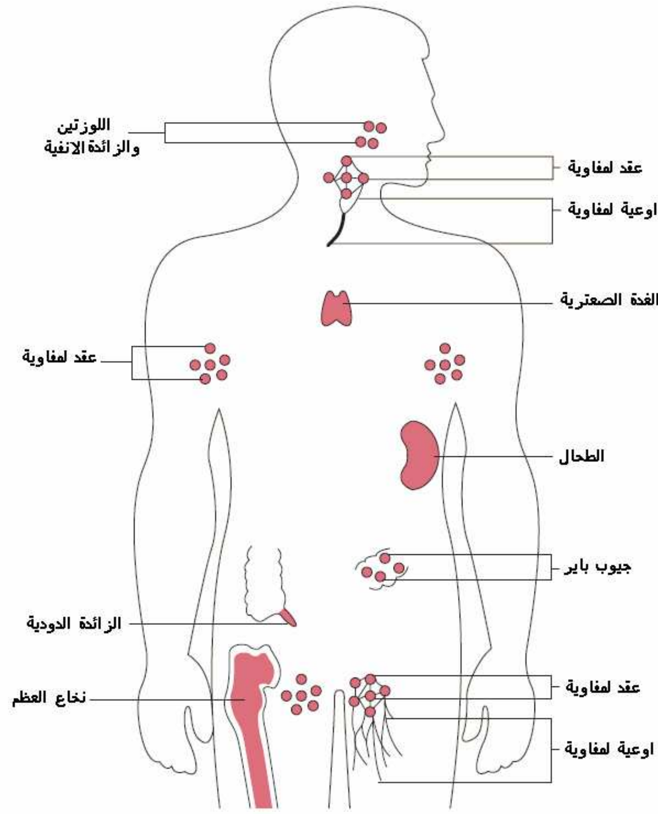
- نخاع او نقي العظام Bone marrow وهو أنسجة رخوة تقع في التجاويف المركزية للعظام ، وهو المزود الرئيس لمختلف أنواع خلايا الدم ومنها خلايا الدم البيض التي يقدر لها ان تصبح خلايا مناعية .
- الغدة الصعترية Thymus gland وهي عضو يقع خلف عظام الصدر الأمامية والتي يتم فيها نضج الخلايا اللمفاوية التائية T- lymphocyte او T-cell .
- العقد اللمفاوية Lymph nodes وتمثل عقد كلوية الشكل توجد على الجدران الداخلية للأوعية اللمفاوية ، وتوجد في تجمعات منها في الرقبة وتحت الإبط والبطن ومناطق مفاصل الفخذ Groin وكل عقدة تحوي على حجيرات داخلية تتجمع فيها الخلايا المناعية التي تهاجم الأجسام الغريبة .
- الطحال Spleen عضو مفلطح يقع في الجانب الأيسر العلوي من البطن يحوي على أجزاء متخصصة تتجمع فيها الخلايا المناعية لتؤدي عملها .

وتتجمع بعض مكونات الجهاز المناعي في مواقع معينة مثل بطانة القناة الهضمية والممرات الهوائية للرئات التي تمثل مناطق الدخول للجسم مثل اللوزتين Tonsils ، Adenoids والزائدة الدودية Appendix ، اما الخلايا اللمفاوية يمكن ان تتحرك خلال الجسم باستعمال الأوعية اللمفاوية Lymphatic vessels الحاوية على اللمف Lymph وهو سائل غير ملون ينتشر في أنسجة الجسم ، والأوعية اللمفاوية تكون موازية للشرايين والأوردة ويتم تبادل المواد والسوائل بين الدم واللمف وبذلك تساعد الجهاز المناعي لتسجيل وجود الإحياء او الأجسام الغريبة ، وتوزيع الاعضاء موضح في الشكل (15) .

ويتكون الجهاز المناعي من :

أولا- الخلايا المناعية

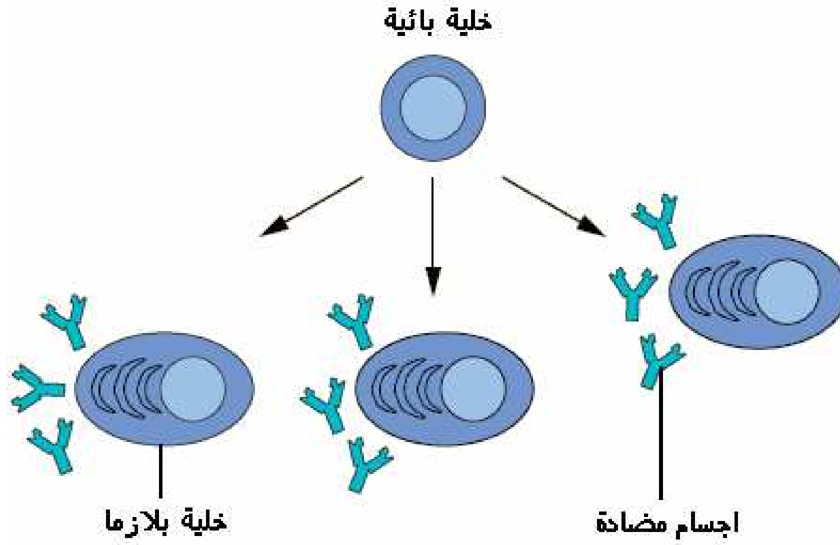
يقوم الجهاز المناعي بتزويد الجسم بالعديد من الخلايا وليس اللمفاويات فقط ويطلق عليها خلايا الدم البيض Leucocytes ، فهو يزود الجسم بالخلايا التي لها القابلية على الابتلاع ومشابهاتها ، فبعض منها تهاجم كل المستضدات في الجسم والبعض الأخر تكون متخصصة في الاهداف التي تهاجمها ، وتتعاون الخلايا المناعية فيما بينها من خلال التلامس الفيزياوي او بواسطة أطلاق مواد كيماوية خاصة والجهاز المناعي يخزن مجموعة قليلة من كل نوع من الخلايا العامة التي تميز أعداد كبيرة من المستضدات وعند ظهور المستضد فان الخلايا الملائمة منه تتكاثر الى حد يمكن القضاء عليه . وبعد أداء واجبها تضمحل تاركة ورائها حراس كي تقوم بواجبها في المستقبل وهي التي يطلق عليها خلايا الذاكرة Memory cells .



شكل 15 : توزيع مكونات الجهاز المناعي في جسم الإنسان

وتبدأ الخلايا المناعية كخلايا جذعية Stem cells غير ناضجة في نخاع العظم ، ثم تستجيب للسايتوكينات (مهجرات الخلايا) Cytokines المختلفة وإشارات أخرى لتنمو الى خلية مناعية متخصصة مثل الخلايا التائية T- cells او الخلايا البائية B- cells او الخلايا الأبتلاعية Phagocytes . ومن الخلايا المهمة في الجهاز المناعي :

الخلايا البائية B- cells : من الخلايا اللمفاوية المهمة في الجهاز المناعي وقد جاء التسمية لأنها تنضج في نخاع العظم واهم وظائفها إفراز الأجسام المضادة Antibodies في سوائل الجسم والتي تهاجم المستضدات في الدم الدائر لانها لا تستطيع اختراق الأغشية الخلوية وكذلك تهاجم خلايا خاصة مستهدفة وهي الخلايا المصابة بالفيروسات او الخلايا السرطانية التي تظهر عليها بعض الواسمات السطحية . أما باقي الواجبات فتترك للخلايا التائية والخلايا المناعية الأخرى . وكل خلية بائية تبرمج لإنتاج نوع واحد من الاجسام المضادة المتخصصة . وعندما تتعرض الخلايا البائية للمستضدات فانها تتحول الى خلايا كبيرة تسمى خلايا البلازما Plasma cells وهي التي انتج الاجسام المضادة كما موضح في الشكل أدناه (شكل 16)



شكل 16 : تحول الخلايا البائية الى خلايا بلازما Plasma المنتجة للأجسام المضادة بعد تعرضها للمستضدات

وخلايا البلازما تكون بمثابة مصانع للأجسام المضادة اذ تصنع الملايين منها وتصبها في مجرى الدم . والتي تقوم بالارتباط الى المستضد وتساعد في تدميره .

الخلايا التائية T- cells: خلايا مناعية مهمة جاءت تسميتها لانها تنضج في العقدة الصعترية وهي لا تميز المستضدات الحرة السابحة ، وتحوي سطوحها على مستلمات متخصصة Antibody- like receptors التي تميز قطع من المستضدات على سطوح الخلايا المصابة او الخلايا السرطانية . وتساهم في الدفاعات المناعية وذلك بتنظيمها وتوجيهها للاستجابات المناعية ، كما ان انواعا منها تهاجم الخلايا المصابة والخلايا السرطانية .

وتقسم الخلايا التائية الى مجاميع ثانوية ، منها الخلايا المساعدة Helper T-cell ، وهذه في البداية تكون Tho وتنتج عددا من السايتوكينات (التي سيأتي ذكره لاحقا) -IFN-γ ,IL-4, IL 2 ووجود هذه المواد في البيئة المحيطة بالخلايا يؤدي الى تمايزها الى Th1 و Th2 .

Th1 تنتج IL-2 ، IFN-γ , TNF-β التي تنشط كل من الخلايا التائية السامة Tc والخلايا الأبتلاعية الكبيرة Macrophages وبذلك فهي تحفز الخلايا المناعية والالتهابات . كما انها تنتج GM-CSF,IL-3 التي تنشط نخاع العظم لانتاج خلايا الدم البيض .

Th2 تنتج IL- 4, IL-5, IL-6, IL-10 التي تحفز انتاج الاجسم المضادة من قبل الخلايا البائية . وتكون سايتوكينات Th1 و Th2 متضادة في الفعالية .

الخلايا التائية القاتلة Killer T- cell : وتسمى ايضا اللمفاويات التائية السامة Cytotoxic T lymphocytes (CTLs) وتحمل على سطوحها الواسمة CD8 وتقوم بوظائف مختلفة .

فهي تقوم بالمهاجمة المباشرة للخلايا التي تحمل على سطوحها بعض الجزئيات غير الطبيعية ، فتهاجم الخلايا المصابة بالفيروسات وذلك لان الفيروسات عادة تتوارى عن معظم مكونات الجهاز المناعي وتبدأ التكاثر داخل الخلايا . والخلايا CTLs تقوم بتمييز بعض القطع الصغيرة لهذه الفيروسات التي تركت على سطح الخلية وتقوم بمهاجمتها وقتلها بعد التلامس معها وربما باستعمال بعض اللمفوكاينات (Lymphokines) مثل البيرفورين Perforin . وتستطيع الخلايا السامة تمييز المستضد اذا كان محمولا على سطح الخلية بواسطة جزيئات MHC والتي تقدم المستضد بشكل ملائم للخلايا التائية .

وتوجد مجموعة اخرى من الخلايا التائية المساعدة التي تحمل على سطوحها الواسمة $CD4^+$ وتكون اساسية لتحفيز تخليق الاجسام المضادة وتنشيط الخلايا التائية السامة CLTs ، كما انها تساهم في بدء تحفيز العديد من الفعاليات المناعية . وتقوم ايضا بتنسيق الاستجابات المناعية وذلك بالتواصل مع الخلايا الأخرى ، فالبعض يحفز الخلايا البائية القريبة لإنتاج الأجسام المضادة وأخرى تساعد الخلايا الأبتلاعية لمهاجمة الميكروبات واخرى تنشط الخلايا التائية الاخرى .

جزيئات MHC (Major Histocompatibilty Complex) : جزيئات المعقد النسيجي الكبير هي جزيئات بروتينية يمكن تميزها بواسطة الخلايا التائية عند تمييزها بين الجزيئات الذاتية وغير الذاتية للجسم . ويوجد منها نوعان MHCI والصنف الأخر MHCII . ويشفر لها بمجموعة خاصة من الجينات MHC genes . وبالرغم من ان جزيئات MHC لازمة لاستجابة الخلايا التائية ضد المستضدات الغازية الا انها تمثل مشكلة عند نقل الأعضاء والأنسجة . فكل خلية في الجسم مغطاة ببروتينات MHC وكل شخص له مجموعته الخاصة من هذه البروتينات على خلاياه ، واذا ميزت الخلايا التائية جريئة غريبة او غير ذاتية على الخلايا فإنها تهاجمها وتدمرها . لذلك وجب عند نقل الاعضاء مطابقة هذه الجزيئات بين الواهب والمستلم الى ابعد حد ممكن والا قامت الخلايا التائية في جسم المستلم بمهاجمة العضو او النسيج المستلم ورفضه Graft rejection .

الخلايا القاتلة الطبيعية Natural killer cells : من خلايا الدم البيض او الخلايا اللمفاوية الكبيرة المميتة ، الخلايا مجهزة بحبيبات مليئة بالمواد الكيماوية السامة القوية ، وهذه الخلايا تمييز الخلايا التي تنقصها جزيئات MHC الذاتية لذلك تكون لها القابلية على مهاجمة انواع مختلفة من الخلايا الغريبة . وهي تشبه الخلايا التائية السامة المذكورة اعلاه من حيث الأداء الوظيفي ، فهي تقوم بملامسة الخلايا المستهدفة ثم إطلاق موادها السامة ، ولكنها تختلف معها في نوعية الجزيئات التي تمييزها الخلايا التائية السامة .

الخلايا الأبتلاعية او البلعمية Phagocytes : وتضم انواعا من الخلايا ، ففي العموم هي خلايا دم بيض كبيرة تستطيع ابتلاع وهضم الميكروبات والجزيئات الكبيرة الغريبة بعملية الابتلاع Phagocytosis وتشمل :

خلايا وحيدة النواة Monocytes : خلايا ابتلاعية تدور في الدم وعندما تنتقل او تهاجر الى الانسجة تتطور الى خلايا ابتلاعية كبيرة Macrophages . تفرز (Monokines المونوكاينات) التي تساعد في توجيه وتنظيم الاستجابة المناعية .

الخلايا الأبتلاعية الكبيرة Macrophages : توجد أنواع متخصصة منها في الاعضاء مثل الرئات والكلى والدماغ وغيرها . وتلعب أدوارا مهمة فهي تخلص الجسم من الخلايا المتهرئة وحطام الخلايا . وتظهر على سطحها جزء من المستضدات الغريبة لجذب انتباه الخلايا اللمفاوية الملائمة للمستضد ، وهذه يطلق عليها تقديم المستضد Antigen presentation ، وتقوم بإفراز المونوكاينات التي تعطي الإشارات اللازمة للاستجابات المناعية وتكون ضرورية لهذه الاستجابات .

الخلايا المحببة Granulocytes : خلايا محببة من خلايا الدم البيض لها القابلية على الابتلاع ، يحوي السايتوبلازم على العديد من الحبيبات الحاوية على المواد الكيماوية القاتلة التي تساعدها في تدمير الميكروبات وكذلك تحوي على بعض المواد الاخرى المهمة مثل الهستامين Histamine الذي يشارك في الالتهابات Inflammations والحساسية . وتضم مجموعة من الخلايا منها :

العدلات Neutrophiles : وهي من الخلايا الأبتلاعية المهمة وتستعمل انواع من المواد الكيماوية لتدمير المكروبات التي تبتلعها .

الخلايا القاعدية و**الحامضية Basophiles , Eosinophiles** : من الخلايا محببة السايتوبلازم المليئة بالمواد القاتلة التي تنطلق لقتل الخلايا المؤذية او الميكروبات .

الخلايا الصارية Mast cells : من الخلايا المحببة وتشبه الخلايا القاعدية ولكنها ليست من خلايا الدم وانما توجد في الأنسجة مثل الجلد والرئات واللسان وفي بطانة الأنف والقناة الهضمية وتكون مكوناتها مع مكونات الخلايا القاعدية مسئولة عن أعراض الحساسية .

الخلايا الشجرية Dendritic cells : احد مكونات الجهاز المناعي وتوجد بكميات قليلة في الأنسجة التي تكون بتماس مع البيئة الخارجية مثل الجلد وتدعى هناك Langerhans cells خلايا لانكرهانس وتوجد ايضا في البطانة الداخلية للأنف والرئات والمعدة والأمعاء . اكتشفت اوائل السبعينيات من القرن الماضي ، توجد في الدم بشكل غير ناضج تدعي بالخلايا المبطنة Veiled cells تحوي على كميات كبيرة من السايتوبلازم ذو تراكيب بطانية ، وفي مراحل معينة تنمو لها زوائد Dendrites ولذلك سميت بالخلايا الشجرية او المتفرعة ، وعندما تنشط وتنضج تدخل الانسجة اللمفاوية وتتداخل مع الخلايا التائية والبائية . ويوجد نوعان منها في الجهاز المناعي البشري

هي Myeloid و Plasmacytoid (بلازماوية الشكل) وكل نوع يحوي على مجاميع ثانوية .فالـ Myeloid DC (MDC) تشبه الخلايا وحيدة النواة وتتكون من MDC1 وهو النوع الشائع و MDC2 وهو نادر ويشارك في إصابات الجروح ، اما الخلايا بلاوماوية الشكل فهي تنتج كميات كبيرة من IFN-α لذلك سميت سابقا Interferon – producing cells (IPC). والخلايا الشجرية هي اكثر الخلايا قوة في تقديم المستضدات الى الخلايا التائية المساعدة وهي أكثرهم تحفيزا لها ، وتغير فعالية الخلايا الشجرية يمكن ان يسبب الحساسة وأمراض المناعة الذاتية مثل Systemic lupus erythematosus (SLE) .

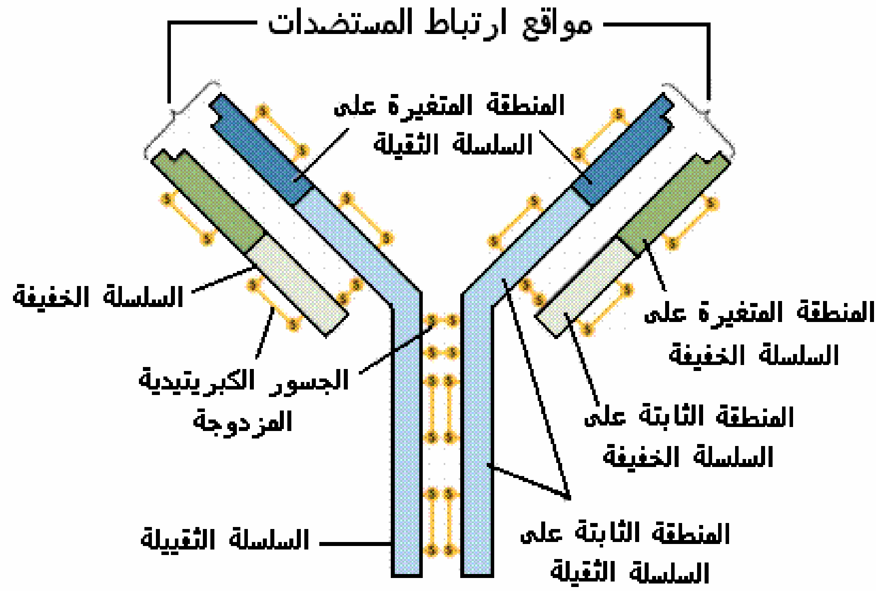
ومن خلايا الجهاز المناعي الاخرى هي خلايا الذاكرة السابقة الذكر وتمثل مجموعة من الخلايا التائية والبائية التي تعرضت للمستضدات وتكون مستعدة للاستجابة عند تعرض الجهاز المناعي للمستضدات نفسها مرة ثانية .

الصفيحات الدموية Blood platelets : تراكيب تحوي حبيبات تساعد في تخثر الدم واندمال الجروح ، كما انها تساعد في تنشيط بعض الاستجابات المناعية .

ثانيا الأجسام المضادة Antibodies : تنتمي الى مجموعة كبيرة من الجزيئات تدعى الگلوبيولينات المناعية Immunoglobulins وتوجد انواع منها تقوم بوظائف دفاعية مختلفة . وتعد من مكونات المناعة الخلطية Humoral immunity ، توجد في بلازما الدم والمصل وكثير من السوائل الجسمية والأنسجة نتيجة التعرض لمواد تولد المناعة Immunogens ، تنتج من الخلايا البائية بعد تحفيزها وتحولها الى خلايا بلازما . وتتكون من البروتينات التي تحوي في بعض الأحيان على الكاربوهيدرات ، تمتاز بالتخصص العالي في التفاعل مع المستضدات .

يتكون التركيب الاساسي للجسم المضاد من أربع بيبتيدات متعددة مرتبة بشكل حرف **Y** وترتبط باواصر كبريتيدية ثنائية Disulphide bonds ، الزوج الاول من البيبتيدات هي الصغيرة او الخفيفة Light chains ويوجد نوعين منها الكابا κ ولمدا λ . اما السلسلتان الثقيلة فيوجد خمسة انواع منها وتؤدي الى تقسيم الاجسام المضادة الى خمسة انواع هي IgA, IgG, IgD, IgM, IgE

تحوي السلاسل الخفيفة على جزأين Domains مكونة من 110 حامض أميني ، اما الثقيلة فتحوي على اربع أجزاء رئيسة . النهاية الامينية للسلاسل تحوي على مناطق متغايرة Variable مثل V_H, V_L ، وأخرى ثابتة تسمى C_L للخفيفة و C_H للثقيلة مثل C_{H2}, C_{H1} C_{H3} . توجد مناطق للارتباط في النهايات المتغيرة مثلFc (Fragment crystallization) و Fv (Fragment variable) و Fab (Fragment Ag binding) وهي القطعة الخاصة للارتباط بالمستضد . والشكل (17) يوضح التركيب العام للاجسام المضادة .



شكل 17 : التركيب العام للاجسام المضادة

وفيما يلي وصف مبسط لانواع الاجسام المضادة :

IgA وهو الكلوبيولين المناعي الفا ، يحوي على سلاسل **α** الثقيلة ويوجد بنسبة 10- 15 % من مجموع الكلوبيولينات المناعية في مصل الانسان ، ويكون بشكل احادي Monomer او مزدوج Dimer . والنوع الإفرازي sIgA يعد من الكلوبيولينات المناعية الرئيسة في سوائل الجسم كالدموع واللبأ Colostrum والحليب وغيرها . له اهمية بالغة لحماية الاغشية المخاطية كأغشية الامعاء والمجاري البولية والتنفسية من اختراق الاحياء المرضية . ويوجد في اغلب الحيوانات اللبونة والطيور ، ويحوي على مجموعتين ثانوية IgA1 , IgA2 . وفي الانسان يكثر في الحليب الذي يصل الى امعاء الوليد بعد الرضاعة ويغطي سطوح الطبقة المخاطية مما يؤدي الى حماية الوليد ضد الإصابات المعوية ، ولوحظ ان الانواع الخاصة المضادة للـ HIV تقل في حليب الأمهات المصابات بالايدز .

IgD الكلوبيولين المناعي دلتا ويحوي على السلسلة دلتا الثقيلة ، يوجد في مصل الانسان الطبيعي بتراكيز واطئة (حوالي 30- 50 مايكروغرام لكل مللتر) وهو من الكلوبيولينات الاساسية الموجودة على سطوح الخلايا البائية الناضجة ويلعب دورا في بدء استجابتها المناعية . تتكون الجريئة الواحدة منه من زوج متماثل من السلاسل الببيتيدية الخفيفة وزوج متماثل من السلاسل الببيتيدية الثقيلة ترتبط باواصر كبريتيدية مزدوجة .

IgG كلوبيولين مناعي گـاما ، يحوي على سلاسل ثقيلة من نوع **γ** ويعد الكلوبيولين الرئيس في الدم ويشكل حوالي 75 % من الكلوبيولينات المناعية ، تركيبه يمثل وحدة اساسية متكونة من زوج

متشابه من السلاسل الببيتيدية الخفيفة وزوج من الببيتيدات المتعددة الثقيلة . وتوجد في الانسان اربعة اصناف ثانوية له هي IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 ويمكن ان تحوي هذه المجاميع على انواع ثانوية اخرى . وينتقل من الأم الى الجنين عبر المشيمة Placenta ، أصنافه الثانوية قادرة على تثبيت المتمم ماعدا IgG4 ، يكون غلاف حول الميكروبات اذ يرتبط الى سطوحها مؤديا الى الاسراع بالتهامها من قبل خلايا الجهاز المناعي الخاصة . ويحوي حليب الأمهات المصابات بالايدز كميات اكبر من باقي الانواع ويوفر حماية للمواليد .

IgM كلوبيولين Mu يحوي على السلسلة الثقيلة **μ** من الكلوبيولينات المناعية يشكل 5- 10% من مجموعة الكلوبيولينات المناعية ويتميز بوزنه الجزيئي العالي 970000 دالتون وذلك لان الوحدة الاساسية منه تتكون من خمس وحدات اولية (Pentamer) . وكل وحدة تتكون من اربع ببتيدات متعددة مرتبطة بأواصر كبريتيدية مزدوجة وعليه فان هذا الصنف يتكون من عشر وحدات خفيفة وعشر وحدات ثقلية ، اضافة الى احتوائه على جزيئة ارتباط J-chain، له قابلية عالية على تثبيت المتمم . يتكون بعد الاصابة وتحفيز الخلايا البائية المنتجة للاجسام المضادة ، ويوجد في حليب الامهات المصابات بالايدز ولكنه بكميات اقل من النوع IgG .

IgE : كلوبيولين ابسيلون المناعي يحوي على السلسلة الثقيلة **ε** وهو من الكلوبيولينات المناعية او الاجسام المضادة المتخصصة في تفاعلات الحساسية وتركيزه اقل من باقي الانواع ، يتأثر بالحرارة وتبطل فعاليته بدرجة حرارة 56° م ، تصل نسبته الى 0.04 %من الكلوبيولينات الكلية . يلعب دورا اساسيا في بدء تفاعلات الحساسية ، فتركيزه في الحالات الطبيعية بحدود 0.00002 ملغم / مللتر من المصل اما عند حصول الحساسية فترتفع الى أضعاف هذه الكمية ويكون ذلك مرافقا لأعراض الحساسية الاخرى .

ثالثا السايتوكينات : بروتينات صغيرة تفرز من خلايا الجهاز المناعي لتعمل كوسائط للتواصل بين مكونات الجهاز المناعي لغرض تنظيم الاستجابات المناعية وتكوين الدم Hematopoiesis . وتخلق استجابة للتحفيز(*de novo*) نتيجة لمحفزات مناعية . وبشكل عام فهي تؤثر ضمن مسافة قصيرة ومدة زمنية قصيرة و بتراكيز واطئة جدا ومنها الانترلوكينات Interleukins (IL) والانترفيرونات Interferons (IFT) وعوامل النمو . البعض منها تكون بمثابة مفاتيح لفتح وغلق فعالية بعض الخلايا المناعية ، لذلك تعد من المحورات الحيوية للاستجابة Biological response modifiers أي أنها تدعم وتزيد مباشرة الدفاعات المناعية ، او تعيد وتغير الدفاعات المناعية الى الحالة الطبيعية .

فعالية السايتوكينات : تؤثر هذه الرسائل الكيماوية بارتباطها الى مستلمات غشائية متخصصة على سطوح الخلايا وتقوم بإعطاء أشارات للخلايا ضمن ناقلات المحفزات الثانوية Secondary messengers والتي هي في اغلب الأحيان كاينيزات التايروسين Tyrosine kinases وبذلك تقوم بتغيير تصرف الخلايا او تقوم بتغيير التعبير الجيني . والاستجابة للسايتوكينات تشمل:

- الزيادة او النقصان في التعبير الجيني عن البروتينات الغشائية وتشمل مستلمات السايتوكينات .
- تكاثر الخلايا .
- إفراز الجزيئات المنفذة Effector molecules .

أنواع السايتوكينات

السايتوكينات اسم عام ويشمل :-

- اللمفوكاينات Lymphokines وهي سايتوكينات تنتج الخلايا اللمفاوية
- المونوكاينات Monokines وهي سايتوكينات تنتج الخلايا وحيدة النواة .
- الكيموكاينات وهي سايتوكينات لها فعالية المساعدة في الانجذاب الكيمياوي Chemotatic وتفرز من قبل الخلايا في موقع الإصابة او الأذى معطية الإشارات للخلايا المناعية للهجرة الى منطقة الإصابة للمساعدة في أصلاح الضرر او مقاتلة الأحياء الغازية . وتلعب دورا أساسيا في الالتهابات وتعد هدفا جيدا لإيجاد وتطوير أدوية جديدة التي يرام منها تعديل الاستجابات المناعية
- الانترلوكينات هي سايتوكينات تنتج من قبل عدد من خلايا الدم بيض أخرى وتؤثر بطرق مختلفة :
  - إذا أثرت السايتوكينات على الخلايا التي تفرزها سمي التأثير Autocrine action
  - إذا أثرت على خلايا قريبة منها سمي Paracrine action
  - إذا أثرت على خلايا بعيدة عنها سمي Endocrine action

ومن الشائع ان تنتج خلايا مختلفة السايتوكين نفسه ، كما ان السايتوكين الواحد يمكن ان يؤثر على أنواع مختلفة أي يكون تأثيره متعدد النمط المظهري Pleiotropy . ومن الملاحظات الأخرى ان محفزات متشابه يمكن ان تحفز بسايتوكينات مختلفة .

والسايتوكينات يمكن ان تعمل بشكل سلسلة من الأحداث فمثلا احد السايتوكينات يحفز الخلية الهدف له لتخليق سايتوكينات أخرى . كما أنها يمكن ان تعمل بشكل متآزر وهذه يعني ان اثنين او أكثر تتآزر لأداء عمل معين . وتوجد أنواع أخرى تعمل بشكل متضاد .

وكل هذه المواصفات أعلاه سواء مدى الحياة القصير جدا والتراكيز القليلة والتنوع في الفعاليات أدى الى تعقيد عزلها وتوصيفها ولكن الجوانب الوراثية تشهد نشاطا واسعا لتحديد الجينات المسئولة عنها ، لأنها تعد من الروافد الواعدة في علاج العديد من الأمراض المستعصية ، كما ان

فعاليات الهندسة الوراثية ومساعدتها في أنتاج السايتوكينات المهندسة وراثيا Recombinant cytokines ساعد في تحديد فعالياتها وتأثيرها على الخلايا خارج الأنظمة الحية ، اما داخل الانظمة الحية فقد استعملت الفئران التي ينقصها الجينات الخاصة (Knock-out mice) بالسايتوكينات لتحديد وظائفها **الانترلوكينات ILs**

تمثل مجموعة من السايتوكينات (1-18) تنتج بشكل اساسي من كريات الدم البيض والبعض تنتج من خلايا متعددة النوى Polymorphnuclear cells (PMNCs) ولكن المنتجات الرئيسة هي الخلايا اللمفاوية التائية المساعدة Th والخلايا الأبتلاعية الكبيرة .

لها عدة وظائف مختلفة واكثرها يعمل في توجيه الخلايا المناعية سواء للانقسام او التمايز Differentiation . وكل واحد من الانترلوكينات يعمل على مجموعة متخصصة ومحددة من الخلايا التي يوجد على سطوحها المستلمات الخاصة به ، وفيما يلي ذكر للبعض المهم منها :

IL-1 : ينتج من قبل الخلايا الأبتلاعية الكبيرة والخلايا وحيدة النواة والخلايا البائية والخلايا الشجرية وغيرها . ويوجد منه نوعين α و β ، يحث الاستجابات الالتهابية Inflammatory responses ويؤدي الى حدوث الورم Edema . ومن تأثيراته الاخرى يشجع انتاج IL-2 والبروستكلاندينات Prostaglandins ويشجع نمو خلايا الدم البيض ويحث ايضا طور التفاعل الحاد Acute phase reaction في الاستجابة المناعية ورفع درجة حرارة الجسم ويضخم انطلاق هرمونات Corticosteroids ، ونتيجة لذلك يؤدي الى ظهور الحمى والارتجاف كاستجابات مفيدة للجسم ، اذ ان ارتفاع الحرارة يؤدي الى منع نمو البكتريا المرضية والتي هي ذات مدى ضيق لدرجات الحرارة Stenothermal . ومن وظائفه الاخرى يؤثر في الخلايا البائية ويساعد في نضجها وتكاثرها ، كما انه يؤثر في الخلايا القاتلة الطبيعية ، اضافة الى تاثيره في الخلايا التائية المساعدة Th .

IL-2 :أهم منتجاته Th1 يؤدي الى اثارة الجهاز المناعي لانتاج الخلايا التائية لذلك يعد من عوامل نمو الخلايا T-cell growth factor (TGF) . وينتج من الخلايا مثل الخلايا التائية المساعدة المحفزة ($CD4^+$)Th وكذلك من الخلايا التائية السامة المحفزة ($CD\ 8^+$) Cytotoxic T- cells وينتج ايضا من الخلايا اللمفاوية الكبيرة المحببة Large Granular Lymphocytes (LGL) . ويؤدي هذا الانترلوكين العديد من الوظائف منها :

- يشجع انقسام وتمايز الخلايا التائية $CD\ 4^+$ والخلايا البائية وخاصة المحفزة بالمستضدات .
- ينشط الخلايا الأبتلاعية الكبيرة والخلايا الشجرية قليلة التفرع Oligodendrocytes
- يكون مسئولا عن نقل الخلايا التائية من مرحلة G1 الى طور التخليق S خلال دورة الخلية .
- يساعد في تحفيز نمو الخلايا القاتلة الطبيعية (NK) وزيادة فعاليتها المحللة للخلايا .

- يحفز انتاج الانترفيرون IFN-γ من قبل الخلايا القاتلة الطبيعية وكذلك يكون مهما في تحفيز وتنشيط الخلايا الأبتلاعية الكبيرة . ونظرا لرفعه مستوى الاستجابة المناعية فهذا يجعله من المواد المؤهلة لمعالجة العديد من الأمراض ، وتشير النتائج الى امكانية استعماله لعلاج بعض السرطانات والتهاب الكبد الفيروسي Hepatitis C وإصابات HIV والايدز .
- يشجع الخلايا البائية على إفراز IgG_{2a} ويمنع IgE , IgG_1 .

IL-3 : ينتج من قبل الخلايا التائية المنشطة وأهمها المساعدة Th وكذلك الخلايا القاتلة الطبيعية ، ويقوم بتحفيز تكاثر اسلاف او طلائع خلايا الدم مثل خلايا الدم الحمر ، والخلايا المحببة والخلايا الأبتلاعية الكبيرة والخلايا اللمفاوية وغيرها وكذلك يؤثر في الخلايا الجذعية . كما انه يستهدف الخلايا الصارية مؤديا الى نموها وإطلاق الهستامين منها .

IL-4 : تنتجه عادة الخلايا التائية المساعدة TH2 ، يساعد في أداء العديد من الوظائف منها:

- يحفز الخلايا البائية المنتجة للأجسام المضادة ويشجع تكاثرها وتمايزها و تخليقها IgG_1 و IgE .
- يشجع نمو الخلايا التائية السامة الحاملة للواسمة $CD8^+$.
- يشجع تمايز الخلايا التائية المساعدة Th2 ، ويثبط فعالية Th1 .
- يحث التعبير عن جزيئات MHC II على الخلايا الأبتلاعية الكبيرة .
- يثبط إنتاج سايتوكينات الالتهابات الأولية Proinflammatory cytokines مثل IL-1 وعامل نخر الورم نوع الفا Tumor necrosis factor (TNF-α) .

IL-5 : ينتج بشكل أساسي من الخلايا التائية المساعدة Th2 ويستهدف الخلايا البائية المنشطة مؤديا الى تكاثرها وتمايزها وتخليق IgA إضافة الى انه يعد عامل رئيس لنمو وتنشيط الخلايا الحامضية Eosinophiles .

IL-6 : ينتج من عدة أنواع من الخلايا منها الارومات الليفية Fibroblasts والخلايا البائية و التائية مثل Th2 والخلايا الأبتلاعية الكبيرة والخلايا البطانية Endothelia cells . وتكون له عدة تأثيرات منها :

- يؤثر في الخلايا البائية مؤديا الى تمايزها وتحولها الى خلايا البلازما منتجة للاجسام المضادة .
- يؤثر في الخلايا الجذعية مؤديا الى تمايزها .
- يؤثر في خلايا مختلفة مؤديا الى حالة الاستجابة الحادة وتخليق بروتينات الطور الحاد في الكبد.

IL-7 : ينتج في نخاع العظم والغدة الصعترية ويؤثر على الخلايا الجذعية مؤديا الى تمايزها الى سوابق للخلايا البائية او التائية والخلايا الأبتلاعية الكبيرة ، وهو عامل منشط لكل من الخلايا التائية والخلايا الابتلاعية الكبيرة .

IL-8 : ينتج من قبل معظم خلايا الجسم وخاصة الخلايا الطلائية وخلايا الابتلاع الكبيرة . يؤثر في العدلات ويشجع ظاهرة الانجذاب الكيمياوي Chemotaxis مما يؤدي الى هجرة الخلايا في الأنسجة الى مكان الضرر ويشجع الالتهابات .

IL-9 : يشجع استجابات الخلايا التائية المساعدة Th1 ولذا فهو يشجع الالتهابات وذلك بمنعه الموت المبرمج او الاستماتة للخلايا التائية T-cell apoptosis .

IL-10 : له صفات قوية مضادة للالتهابات ويلعب دورا مهما في توازن الجهاز المناعي وينتج من الخلايا التائية المساعدة TH2 يؤثر في الخلايا الابتلاعية الكبيرة ويساعدها على إنتاج بعض السايتوكينات ، ولكنه يمنع إنتاج IL-1 ، IL-6 ، عامل التخمر الورمي TNF-α وكذلك يثبط Th1 من إفراز INF-γ وIL-2 كما انه يثبط التعبير عن MCH II وكذلك إنتاج الجزيئات المسئولة عن قتل البكتريا وإنتاج السايتوكينات الالتهابية من الخلايا الأبتلاعية الكبيرة ، يؤثر في الخلايا البائية وينشطها ولذلك يعد من المنشطات المهمة لها . كما انه يخفض الاستجابات المضادة للفيروسات وذلك بتثبيطه لإنتاج الانترفيرون كاما IFN-γ ، كما انه يمنع تقديم او تجلية المستضدات Antigen presentation .

IL-12 : ينتج من الخلايا الابتلاعية الكبيرة وكذلك من الخلايا البائية ويؤثر في الخلايا التائية السامة Tc المنشطة ويؤدي الى تمايزها الى CTL بمساعدة IL-2 ، كما انه يؤثر في الخلايا القاتلة الطبيعية NK ويحفزها ويعاكس فعالية IL-10 ، يشجع الخلايا التائية المساعدة Th1 في تأثيرها على الخلايا الابتلاعية الكبيرة ، كما انه يشجع أنتاج IFN-γ الذي له ادوارا مشابهة للـ IL-18 .

IL-13 : يشابه من حيث التركيب والوظيفة IL- 4 ، يشجع تمايز الخلايا البائية . ويثبط الخلايا التائية المساعدة Th2 كما انه يثبط الخلايا الأبتلاعية الكبيرة من إنتاج السايتوكينات الالتهابية .

IL-15 : يشابه IL-2 في العديد من الفعاليات الحيوية وينتج من قبل الخلايا الطلائية والخلايا وحيدة النواة Monocytes . ويؤثر في مجموعات من الخلايا فهو يشجع فعاليات الخلايا القاتلة الطبيعية NK ويشجع السمية الخلوية Cytotoxicity كما انه يشجع الخلايا البائية على التكاثر وإفراز الكلوبيولينات المناعية .

IL-17 : يشجع إنتاج سايتوكينات الالتهاب .

IL-18 : يشجع إنتاج الانترفيرون كاما IFN-γ من قبل الخلايا التائية والبائية والخلايا القاتلة الطبيعية ، كما انه يشجع من عملية الابتلاع التي تؤدي الى التخلص من الميكروبات ، ويضخم القابلية السمية

للخلايا التائية السامة والخلايا القاتلة الطبيعية كما يساعد في تنظيم وظائف الخلايا التائية المساعدة ، وكذلك يضخم توليد المناعة عند استعمال اللقاحات الوقائية .

الانترفيرونات Interferons (IFNs) :

وتعرف بعض الأحيان على أنها بنسلينات الفيروسات لانها تمنع تضاعف الفيروسات في الخلايا المصابة وتؤثر في الخلايا المناعية ويؤدي الى تغيير صفاتها وتنتج منه انواع منها :

IFN-α : ينتج من خلايا الدم البيض ويؤثر على خلايا مختلفة ويؤثر في تضاعف الفيروسات ويؤثر ايضا في التعبير عن MHC I . ويعمل على حماية الخلايا من الإصابات الفيروسية والميكروبية ويحمي الجسم ضد السرطانات .

IFN-β : ينتج من الارومات الليفية ويستهدف خلايا متنوعة ويشابه النوع الفا ، اذ يؤثر في تضاعف الفيروسات والتعبير عن MHC I .

IFN-γ : تنتجه عدد من الخلايا مثل الخلايا التائية المساعدة Th1 والخلايا التائية السامة Tc والخلايا القاتلة الطبيعية . ويستهدف انواعا مختلفة من الخلايا مؤديا الى التاثير على تضاعف الفيروسات كما انه يؤثر في :

- الخلايا الأبتلاعية الكبيرة اذ يؤثر في التعبير عن جزئيات MHC II ويقللها ، كما انه يساعدها في التخلص من الممرضات وإزالتها .
- يؤثر في الخلايا التائية المساعدة Th2 ويحث تكاثرها وإنتاج عددا من الانترلوكينات مثل IL- 4 ,IL-5 , 10 .
- يؤثر في الخلايا البائية المنشطة ويؤدي الى حرف إنتاج الكلوبيولينات المناعية بنمط معين لإنتاج IgG_{2a} ويثبط إنتاج IgG_1, و IgE .
- ينشط الخلايا الابتلاعية الكبيرة والخلايا القاتلة الطبيعية .

ونظر لدوره المتعدد والمهم لذلك يكون له دورا في الدفاعات الجسمية ضد الميكروبات الغازية خاصة التي تدخل الخلايا مثل *L. monocytogenes* وبكتريا السل *Mycobacterium tuberculosis* والفيروسات وكذلك في الدفاع ضد الأورام . وقد وجد ان جسم الإنسان والفئران تفرز كميات قليلة منه لوضع الجسم في حالة إنذار وتأهب ضد الخلايا الورمية والفيروسات والأحياء الممرضة ، ونظرا لقصر العمر النصفي Half life فأن تراكيزه تكون قليلة وبالتالي يصعب قياسها حتى في حالة حث إنتاجه لذلك يستعمل قيـــاس فعالــــية الانزيم 2' 5' A synthetase لتحديد تركيزه IFN-γ، .

عامل نخر الورم Tumor necrosis factor (TNF) :

ويوجد منه نوعان :

- **TNF-α** : ينتج من الخلايا الأبتلاعية الكبيرة والخلايا الصارية والخلايا القاتلة الطبيعية ، يؤثر في التعبير عن السايتوكينات ، كما انه يؤثر في الخلايا الورمية مؤديا الى موتها . فعليه فهو يزيد من القابلية الأبتلاعية والقضاء على الميكروبات ويزيد من ظاهرة تسمم الخلايا الورمية .
- **TNF-β** ينتج من الخلايا التائية المساعدة Th2 والخلايا التائية السامة Tc ويؤثر في الخلايا االابتلاعية مؤديا الى تنشيط عملية الالتهام وإنتاج اوكسيد النتروجين NO . ويؤثر في الخلايا الورمية وقتلها .

عامل النمو الورمي β Tumor growth factor (TGF- β) : وينتج السايتوكايين من الخلايا التائية ووحيدات النواة وله عدة أهداف يؤثر فيها :

- يشجع ظاهرة الانجذاب الكيماوي للخلايا وحيدة النواة والخلايا الأبتلاعية الكبيرة للهجرة الى مواقع الإصابة .
- يؤثر في الخلايا الأبتلاعية الكبيرة المنشطة ويساعدها في تخليقIL-1 .
- يشجع الخلايا البائية المنشطة على تخليق IgA .
- يؤثر في خلايا مختلفة مؤديا الى تكاثرها .
- له دور في مضادة الالتهابات ، ويلعب دورا رئيسا في توازن الجهاز المناعي .

عامل تحفيز المستعمرات Granulocyte-monocyte colony –stimulating factor (GM-SCF) :

تفرزه الخلايا التائية المساعدة Th1 ، يؤثر في نخاع العظام والخلايا الأولية فيه ويؤثر في تحفيز وتمايز الخلايا وحيدة النواة والخلايا الشجرية ، فهو يشارك ويحفز عمليات تكوين الدم .
ومن السايتوكينات الأخرى هي الكايموكينات وتساعد في جذب خلايا الدم البيض الى مواقع الإصابة وتقسم على أساس احتوائها على ثمالات السستئين Cysteine residues
وإضافة الى ذلك توجد أكثر من 100 من السايتوكينات في الإنسان لا مجال لذكرها .

مستلمات السايتوكينات :

تؤثر السايتوكينات على الخلايا المستهدفة بالارتباط الى مستلمات خاصة تقع على الغشاء الخلوي ، والمعقدات او التراكيب الناتجة من ارتباط السايتوكينات والمستلمات الخاصة بها تقسم الى عدة مجاميع اعتمادا على التركيب والوظيفة ومنها :

Hematopoietic family : وهذه تتكون من وحدتين او ثلاث وحدات تتميز بوجود منطقة ثابتة تحوي على مكررات من الحامض ألأميني السستئين في الجزء الخارجي منها ، وكذلك تحوي على منطقة ثابتة من تسلسل خاص من الأحماض الامينية Trp-Ser-X-Trp-Ser ، ومنها مستلمات الانترلوكينات GM-CSF, IL-7, IL-2 . وهذه العائلة تعرضت لدراسات

مسهبة مقارنة بباقي العوائل من المستلمات . وهي تتكون من وحدتين بشكل عام كما ذكر أنفا . إحدى الوحدتين هي الخاصة بارتباط السايتوكين وهي الوحدة ألفا α والأخرى β لنقل الإشارات . ويكون ارتباط السايتوكايين بالوحدة ألفا بألفة واطئة ولكن الوحدة بيتا تزيد من ارتباط السايتوكايين الى المستلم ، وهذا الارتباط يحفز تكوين تركيب ثنائي الوحدات من ألفا وبيتا وبدوره يؤدي الى الارتباط مع كاينيز التايروسين الذي يقوم بفسفرة مجموعة من البروتينات مما يؤدي الى زيادة انتساخ وانتاج جزيئات من mRNA المعنية .

عائلة الانترفيرون : تحوي على المناطق الثابتة الحاوية على السستئين المذكورة للعائلة أعلاه ولكنها تختلف بالنسبة لتسلسل الحوامض الامينية في المنطقة الثابتة (Trp-Ser-X-Trp-Ser) وتشمل مستلمات IFN-α ، IFN -β ، IFN-γ .

عائلة عامل النخر الورمي : وتحوي المستلمات على أربعة وحدات خارجية (أي خارج الغشاء الخلوي) وتشمل مستلمات TNF-α ، TNF-β وكذلك تشمل CD40 (المهم في تنشيط الخلايا البائية والخلايا الأبتلاعية الكبيرة) ، كما تشمل العائلة على Fas المسئول عن أعطاء الإشارات للخلية لتدخل مسار الاستماتة .

عائلة الكيموكاينات : وتتكون هذه المجموعة من المستلمات من سبعة تراكيب حلزونية تستعرض الغشاء الخلوي (Transmembrane) وتتداخل مع G protein الموجود في الغشاء[وهو من المستلمات الموجودة على سطح الخلايا ويرتبط بالكوانين . فعندما يكون معطلا يرتبط بـ GDP وعندما ينشط يرتبط بـ GTP وهذه العملية تعمل بمثابة عمليات فتح وغلق (on/off) . ويتكون من ثلاث وحدات ثانوية α، β،γ تعمل على نقل الاشارات الى الخلية] . وتشمل المستلمات الخاصة بـ IL-8 والمونوكينات وغيرها .

والمستلمات CCR5 وCXCR4 تعود الى هذه المجموعة وتستعمل من قبل HIV كي يدخل الفيروس الى الخلايا التائية او الخلايا الابتلاعية الكبيرة

ان فعاليات السايتوكينات يمكن ان تتوقف او تغلق بالتضاد وذلك بوجود جزيئات يمكن ان ترتبط بالسايتوكين او المستلم الخاص به ، ويمكن ان يحصل التضاد بواسطة الميكروبات ، فمثلا مجموعة فيروسات Vaccinia viruses (فيروس الجدري Smallpox وجدري الأبقار Cowpox) تنتج جزيئات ذاتية ترتبط بـ IFN -γ وتبطل فعاليته ، اما الفيروسات الاخرى فيمكن ان تنتج موادا مشابهة للانترلوكينات تؤدي الى احباط مناعة الجسم .

رابعا - المتمم Complement

من مكونات الجهاز المناعي المهمة المشاركة في المناعة الخلطية الموجودة في المصل إضافة الى ما ذكر من أنواع الخلايا والأجسام المضادة والسايتوكينات . وهو نظام يتكون من حوالي 25

بروتين تعمل سوية لتكمل عمل الأجسام المضادة في تدمير الخلايا لذلك سمي بالمتمم ويساعد الجسم في التخلص من المستضدات المرتبطة مع الأجسام المضادة .

وتساعد بروتينات المتمم في حصول الاستجابة الالتهابية التي تتميز بالاحمرار وارتفاع درجة الحرارة والانتفاخ نتيجة وجود الإصابة وذلك لزيادة ورود الدم الى المنطقة وزيادة الخلايا المناعية وزيادة إفرازاتها . ومساهمة مكونات المتمم في هذه الأحداث إنها تجعل الأوعية الدموية متمددة وناضحة

وتدور بروتينات المتمم بشكل غير نشط في الدم ، وعندما ينشط أول بروتين من السلسلة بواسطة الجسم المضاد الذي يكون قد ارتبط بالمستضد ، تبدأ سلسلة من التفاعلات تعرف Complement cascade وكل بروتين يأخذ دوره الدقيق في سلسلة التفاعلات . وينتج عن ذلك تركيب اسطواني يقحم في جدار الخلية البكتيرية او أي خلية أخرى مستهدفة مؤديا الى تكوين ثقب وانتفاخ الخلية ثم انفجارها . كما ان بعض مكونات المتمم تجعل البكتريا أكثر عرضة وحساسية لعملية الابتلاع ، كما انه يساعد في جلب الخلايا المناعية الى المنطقة المصابة . وملخص الخطوات موضح في الشكل (18)

وقد وجد ان سلالات مختلفة من بكتريا حامض اللاكتيك لها قابليات مختلفة في التأثير على التعبير عن مستلمات المتمم في الخلايا الأبتلاعية فمثلا *Lb. rhamnosus, Lc. lactis* لهم تأثير في تنظيم وزيادة المستلمات على خلايا الدم البيض وكانت الأولى أكفا كما ان التعبير كان معتمدا على الجرعة الدنيا 10^9 وحدة تكوين المستعمرات / يوم .

وبعد التحدث عن مكونات المناعة لا بد من المرور على بعض مواصفات المناعة .

أنواع المناعة

المناعة يمكن ان تكون قوية او ضعيفة ، طويلة الأمد او قصيرة وغيرها من المواصفات التي تعتمد على عدد من الظروف منها :

1- نوع المستضد .

2- كمية المستضد .

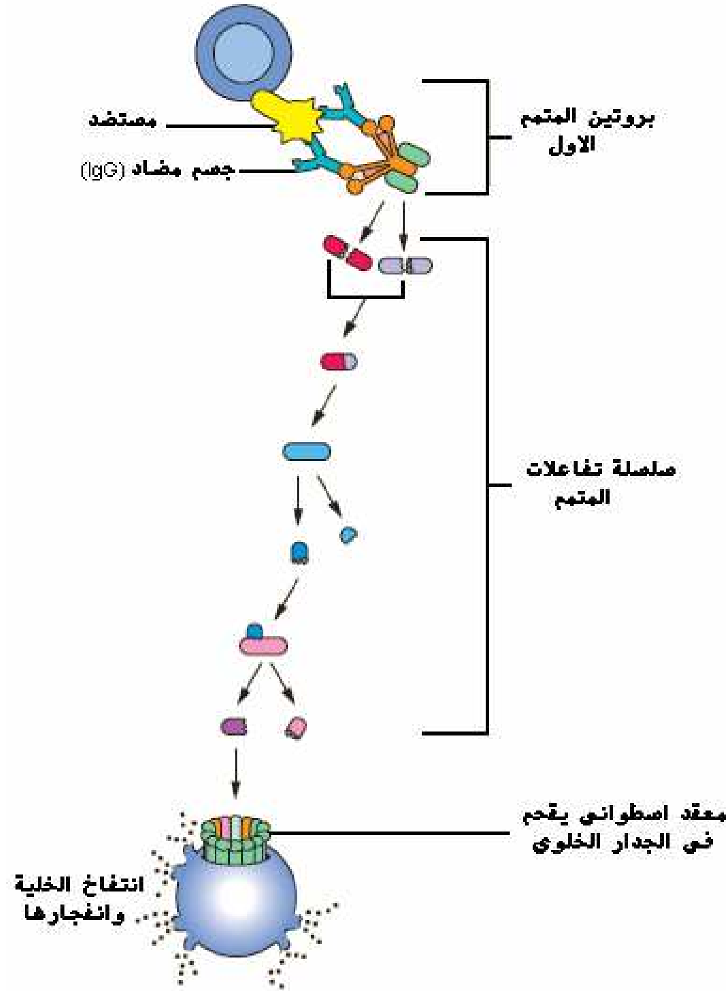
3- الطريق الذي دخل به المستضد الى الجسم .

4- العوامل الوراثية .

فالمناعة يمكن ان تنطلق ليس بالإصابة فقط ولكن يمكن ان تبدأ بعملية التمنيع Immunization باللقاحات الوقائية Vaccines الحاوية على أحياء معينة مقتولة او مضعفة او لقاحات Microbial DNA التي توهم الجسم بان هناك اصابة حدثت فتثير الاستجابة المناعية دون حدوث الأمراض . ويمكن ان تنقل المناعة من شخص الى أخر بحقن المستلم مصل Serum غني

بالأجسام المضادة ضد ميكروب معين كما في إعطاء المصول المضادة (Antiserum) لحماية المسافرين من التهاب الكبد الفيروسي Hepatitis A الواسع الانتشار . وهذا يطلق عليه بالمناعة السلبية او المفتعلة Passive immunity ويمكن ان تستمر أسابيع او أشهر ، وتعمل هذه المناعة أيضا لحماية المواليد بالأجسام المضادة الآتية من الأم التي يكون قد استلمها قبل الولادة ومن حليب الثدي بعد الولادة

ومن جهة ثانية يمكن ان تقسم المناعة الى قسمين :



شكل 18 : سلسلة تفاعلات المتمم

1 - المناعة المكتسبة Acquired immunity او المتخصصة والتي تحفز بمستضدات خاصة وتزداد فاعليتها عند التعرض المستمر للمستضدات ويطلق عليها بالمناعة الفعالة أيضا Active immunity .

2 - المناعة الطبيعية Innate immunity وهي غير متخصصة ولا تحتاج الى تحفيز ولا تزداد بالتعرض المستمر للمستضدات . وتتمثل المناعة الطبيعية بالحواجز الطبيعية مثل الأغشية والمخاط وقابلية الابتلاع للخلايا الأبتلاعية وفعالية الخلايا السامة للعدلات والخلايا وحيدة النواة والخلايا القاتلة

أما المناعة المكتسبة فتصنف الى قسمين رئيسين اعتمادا على مكونات الجهاز المناعي التي يقوم بها وهي :

- المناعة الخلطية Humoral immunity وهي تضم بروتينات الطور الحاد والسايتوكينات والمتمم والأجسام المضادة .
- المناعة الخلوية Cell-mediate immunity وهي المناعة التي تقوم بها عدد من الخلايا مثل الخلايا التائية بأنواعها المؤثرة مثل الخلايا المساعدة والخلايا السامة وخلايا الذاكرة وأنواع أخرى من الخلايا (التي سيأتي ذكرها لاحقا) . ويعد هذا النوع المناعة هو المؤثر في الإصابات الميكروبية التي تتخذ من الخلايا مقرا لها Intracellular والذي يمكن ان يكون أفضل الأماكن لتكاثرها ، وبذلك تكون هذه الجراثيم بمنأى عن تأثير الأجسام المضادة ، ويكون هذا النوع من المناعة مسئولا عن تفاعلات الحساسية المتأخرة Delayed type hypersensitivity (DTH) ، ورفض الأنسجة والأعضاء الغريبة ومراقبة حدوث الأورام .

والخلايا الأبتلاعية بالإضافة الى مشاركتها في المناعة غير المتخصصة المذكورة اعلاه فانها تشارك في القسم الثاني من المناعة بعملها كخلايا مقدمة للمستضدات وكذلك من خلال إنتاجها لبعض الوسائط المنظمة مثل السايتوكينات و Eicosanoids .

ويمكن ان تقسم المناعة بشكل آخر اعتمادا على طبيعة الحدوث الى :

- المناعة الطبيعية الفعالة Natural active immunity وتحدث هذه أثناء الإصابة الطبيعية وتسمى فعالة لان اللمفاويات تكون قد نشطت بالمستضدات الموجودة على سطوح الممرضات .

- المناعة الفعالة الصناعية Artificial active immunity فهي تحصل من اخذ المستضدات عن طريق الفم او غيره وهذه تأخذ وقت طويل الى حين تنشط الخلايا التائية والبائية ولكنها تعطي مناعة طويلة الأمد .

ومن ناحية تنشيط الجهاز المناعي والاستجابة فيمكن ان تقسم المناعة الى :

- مناعة سلبية طبيعية Natural passive immunity وهي تتم بنقل مكونات المناعة خلال المشيمة والحليب .

- المناعة السلبية المصطنعة Artificial passive immunity وهي تتم بنقل الأجسام المضادة وتستعمل في الأمراض الخطيرة وتعطي استجابة آنية مثل لقاحات

الكزازTetanus الذي يتم بحقن الاجسام المضادة للسموم Antitoxins ، وبما ان هذه الأجسام المضادة ليست من الجسم فهي تكون آنية ولا تؤدي الى خلق خلايا الذاكرة كما هو الحال في حالة المناعة الفعالة التي تحث تكون خلايا الذاكرة وتكون حمايتها دائمة .

وعلى العموم فان المناعة الفعالة تأخذ عدة أسابيع لتصبح فعالة ولكنها تستمر لمدة طويلة أما المفتعلة او السالبة فيكون تأثيرها سريع ولكنها لا تدوم طويلا .

التحمل المناعي Immune tolerance

حالة من عدم الاستجابة المناعية لمستضد معين او مجموعة من المستضدات وذلك نتيجة قابلية الخلايا البائية او الخلايا التائية لإهمالها ، كما في تحمل أنسجة الجسم نفسه ، ومن الضروري إدامة هذا التحمل حتى يمنع الجهاز المناعي من مهاجمة الجسم ذاته ويحدث التحمل على مستويات :

1- التحمل المركزي Central tolerance ، ويحدث أثناء تطور اللمفاويات ففي الأوقات المبكرة من حياة الخلية المناعية تتعرض للعديد من الجزيئات الذاتية في الجسم ، فإذا هاجمت الخلايا غير الناضجة هذه الجزيئات فان المهاجمة تنشط مسار التدمير الذاتي Internal self-destructive pathway مما يؤدي الى موتها أي حث الاستماتة وتدعى هذه العملية بحذف النسيلة Clonal deletion وهذه تساعد في التأكد من ان الخلايا النشطة ضد الجزيئات الذاتية سواء كانت الخلايا تائية او بائية سوف لا تنضج ولا تهاجم أنسجة الجسم ، وعليه فان اللمفاويات الناضجة لا تهاجم جزيئات الجسم وإنما تكون قد تعلمت إنكارها والتغاضي عنها .

2 - التحمل المحيطي Peripheral tolerance ، في هذا النوع من التحمل تكون اللمفاويات الدائرة في الدم قادرة على تميز الجزيئات الذاتية ولكن لا تستطيع ان تستجيب لها وذلك لان بعض الإشارات اللازمة للاستجابة وتنشيط الخلايا غير موجودة وهذا ما يطلق عليه Clonal anergy ولذا تبقى الخلايا اللمفاوية المؤذية مغلقة الفعاليات . وهذا التحمل يمكن ان يتم بواسطة صنف خاص من الخلايا التائية المنظمة التي تمنع الخلايا التائية المساعدة والخلايا التائية السامة من ان تنشط بالمستضدات الذاتية . ويمكن ان يحصل التحمل بواسطة الخلايا التائية المخمدة Suppressor T-cell. إضافة الى إمكانية إشراك الأجسام المضادة التي تسمى الأجسام المضادة الغالقة Blocking antibodies مثل بعض اصناف IgG .

عمل الجهاز المناعي

لعل أهم الأجزاء التي تتعرض للمستضدات الخارجية هي القناة الهضمية والتنفسية التي تكون مبطنة بطبقة مرصوصة من الخلايا الطلائية . وهي مغطاة بطبقة من المخاط التي تمنع او تغلق نقل العديد من الأحياء . وتحت الطبقة الطلائية يوجد العديد من الخلايا المناعية مثل الخلايا الأبتلاعية

الكبيرة والخلايا التائية والبائية . والأخيرة تقوم بإفراز الاجسام المضادة IgA الذي ينتقل الى المخاط ويكون هو أول الأجسام المضادة التي تهاجم الخلايا الغازية .

وبعد ان تعبر الأحياء الحواجز الأولى تواجه مرحلة متخصصة من الاستجابة والتي تكون مخصصة لها وتشمل أنواع أخرى من الأجسام المضادة والخلايا التائية التي تكون مزودة بمستلمات ذات تراكيب خاصة تسمح بتميز الأحياء الغازية والتداخل معها .

اغلب البكتريا التي تعيش في الفراغات بين الخلايا تهاجم من قبل الأجسام المضادة وعندما ترتبط أليها ترسل أشارة خاصة الى بروتينات المتمم والخلايا الأبتلاعية لتدمير البكتريا المرتبطة بها . أما الأحياء الأخرى المتطفلة داخل الخلايا مثل الفيروسات وبعض البكتريا فهذه تحتاج الى طريق آخر للتخلص منها . فالخلايا المصابة تستعمل جزيئاتها من MHC لوضع قطعة من الكائن الغازي على سطحها معطية إشارة الى الخلايا التائية السامة لتدمير الخلية المصابة . كما ان الأجسام المضادة يمكن ان تشارك في التخلص من الفيروسات وذلك بالارتباط إليها قبل ان تدخل الخلايا .

وبعد أداء الأدوار المذكورة أعلاه والتخلص من المستضدات الغازية فان بعض الخلايا المنشطة من الخلايا البائية والتائية تصبح خلايا ذاكرة Memory cells تنشط عند ورود المستضد ثانية لتدميره .

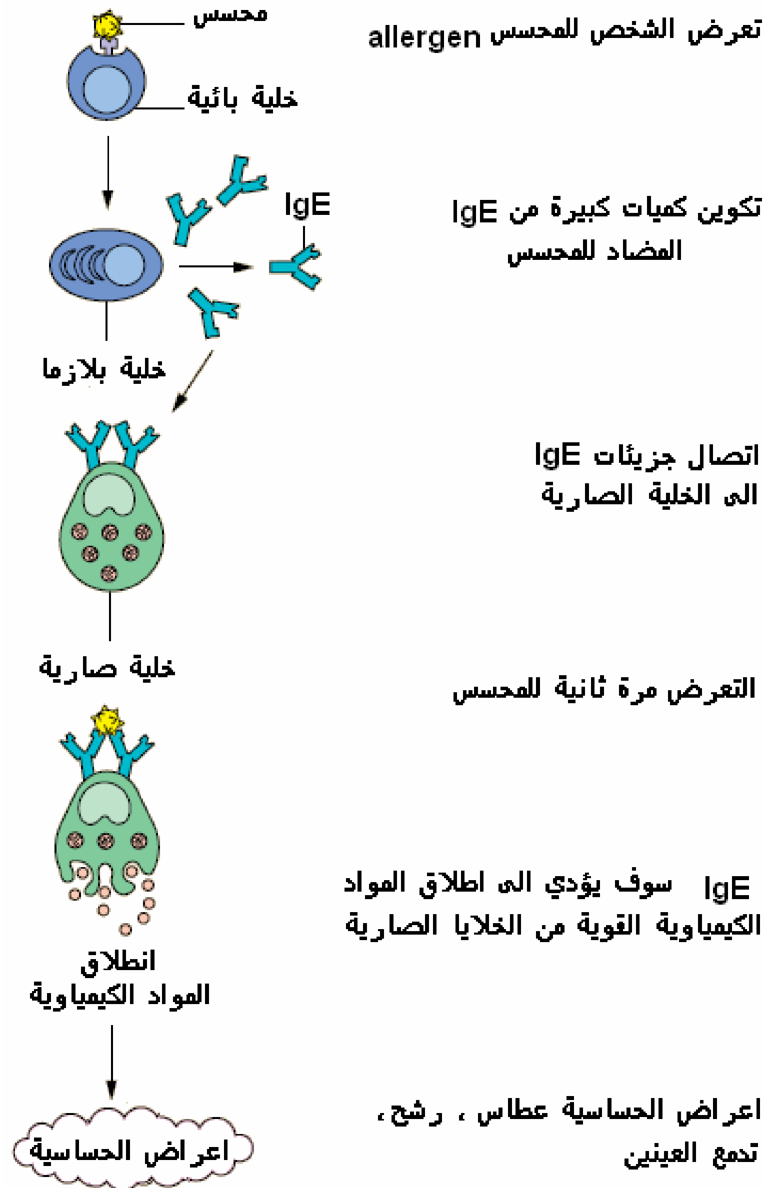
اضطرابات الجهاز المناعي

تصيب الجهاز المناعي اضطرابات تؤدي الى فشله في وظائفه وبالتالي توليد الأمراض ومن هذه الأمراض :

الحساسية Allergy

تحدث أمراض الحساسية او ما يسمى بفرط التحسس عندما يختل التوازن بين الخلايا التائية المساعدة Th1 ،Th2 وكذلك تحصل عند استجابة الجهاز المناعي لمنذرات كاذبة . فالعديد من المواد غير المؤذية يمكن ان تثير الجهاز المناعي وتؤدي الى حدوث الأخطار .

في حالة الحساسية تتحفز الخلايا التائية المساعدة Th2 لإنتاج السايتوكين IL- 4 الذي يشجع إنتاج IgE . والأخير له دور مختلف حسب نوع الحساسية ففي النوع الأول من الحساسية ترتبط جزيئاته الدائرة على سطوح الخلايا الصارية او الخلايا القاعدية بمستلمات خاصة ثم ترتبط جزيئتين متجاورة منه للمتحسسات Allergens مكونة جسورا وبعد تكوين هذه الجسور تجري تفاعلات كثيرة في أغشية الخلايا مما يؤدي الى إطلاق العديد من المواد الخاصة بالحساسية مثل الهستامين والإنزيمات من الحبيبات الموجودة داخل سايتوبلازم الخلايا مؤديا الى حدوث التفاعلات الخاصة بالحساسية . والشكل (19) يمثل سلسلة تفاعلات الحساسية من النوع الأول الذي يشارك منها IgE .



شكل 19 : تفاعلات IgE في الحساسية

وتقسم الحساسية الى عدة أقسام وحسب Gell, Coombs اللذان قسما أنواع الحساسية عام 1963 الى خمسة أنواع تختلف فيما بينها في المكونات المناعية المشتركة .

أمراض المناعة الذاتية Auto- immune diseases

يحصل بعض الأحيان اضطراب في الجهاز المناعي ويبدأ بتكوين أجسام مضادة ذاتية Autoantibodies وخلايا تائية تهاجم خلاياه وأعضاءه أي ان هذه الخلايا غير موجه بشكل صحيح ، ولذلك تؤدي الى أمراض عديدة مثل :

- عند مهاجمة الخلايا التائية لخلايا البنكرياس وخاصة خلايا بيتا β -cells من جزر لانكرهانس المنتجة للأنسولين تؤدي الى الإصابة بمرض السكري Diabetes mellitus .

- الأجسام المضادة الذاتية المعروفة باسم العوامل الروماتويدية Rheumatoid factors هي شائعة في الأشخاص اللذين عندهم التهاب المفاصل الروماتويدي Rheumatoid arthritis

- وكذلك تشارك الأجسام المضادة الذاتية في مهاجمة الخلايا في حالة أمراض SLE (Systemic lupus erythematosus) .

وأمراض المناعة الذاتية يمكن ان تسببها عدة عوامل منها :

- مكونات في البيئة مثل الفيروسات وبعض الأدوية وضوء الشمس وهذه يمكن ان تؤدي الى تدمير او تغيير خلايا الجسم الطبيعية .
- الهرمونات وهي تلعب دورا هاما في الحساسية كما هو واضح من شيوعها في النساء اكثر من الرجال ، كما ان الصدمات Shocks المفاجئة او الإجهاد Stress التي تؤدي الى تغيرات هرمونية يمكن ان تؤدي الى أمراض مناعية ذاتية .
- الوراثة يمكن ان تكون احد الأسباب الرئيسة والمهمة ، فقد وجد ان المصابين بإمراض المناعة الذاتية يملكون أنواعا خاصة من الجزيئات والواسمة الذاتية .

أمراض المعقدات المناعية Immune complex diseases

المعقدات المناعية هي تجمعات من المستضدات المتداخلة مع الأجسام المضادة وتحت الظروف العادية يتم التخلص منها سريعا من مجرى الدم ولكن في بعض الأحيان تستمر بالدوران وأخيرا يتم اقتناصها في أنسجة الكلى والرئات والجلد والمفاصل او الأوعية الدموية . وهناك تبدأ بالتفاعلات مع المتمم مؤدية الى الالتهابات وتدمير الأنسجة التي استقرت فيها .

أمراض نقص المناعة Immune deficiency diseases

تظهر هذه الأعراض عندما يفقد الجهاز المناعي احد مكوناته وقد تكون هذه الأمراض مستورثة او مكتسبة او تظهر نتيجة تناول بعض الأدوية كما في مرضى السرطان او الذين أجريت لهم عمليات زرع الأعضاء ، وقد تكون الأعراض وقتية تعقب الإصابة ببعض الفيروسات مثل الأنفلونزا ومرض كثرة الوحيدات العدوائية Infectious mononucleosis والحصبة ، ويمكن ان تعقب عمليات نقل الدم والجراحة والتغذية السيئة والتدخين والاجهاد .

وتحصل أيضا عند الأطفال الذين لا يعمل جهازهم المناعي بشكل جيد او يوجد عندهم بعض الاضطرابات في الخلايا البائية التي لا تستطيع ان تنتج الأجسام المضادة ، وكذلك عند الأطفال الذين تكون غددهم الصعترية صغيرة او غير طبيعية ، او الذين عندهم نقص في الخلايا التائية . ونادرا ما

يولد الأطفال بدون دفاعات مناعية وعند حصولها يطلق عليها Sever combined (SCID) immunodeficiency diseases .

الايدز : وهو احد أمراض نقص المناعة يسببه الفيروس HIV الذي يصيب الخلايا المناعية ، اذ ان الفيروس يدمر او يعيق فعالية الخلايا التائية او الخلايا الأبتلاعية الكبيرة التي يرتبط عليها بواسطة المستلمات CCR5 ، CXCR4 مؤديا الى حصول أنواع مختلفة من القصور او العجز المناعي والفيروس يمكن ان يختبئ لمدة طويلة داخل الخلايا المناعية ، ولكن عند نشاط الفيروس يتداعى الجهاز المناعي في وظائفه مؤديا الى وقوع المصاب فريسة للعديد من الإصابات المهددة للحياة ومنها السرطانات .

سرطان الجهاز المناعي

خلايا الجهاز المناعي يمكن ان تنفلت من دورة حياة الخلية وتنمو بدون سيطرة كما في حالة Leukemia's (ابيضاض الدم) والتي تنتج من تكاثر خلايا الدم البيض . وفي حالة نمو الخلايا المنتجة للأجسام المضادة بشكل غير طبيعي فإنها تؤدي الى حصول Multiple myeloma . اما سرطان الأعضاء اللمفاوية فيعرف بـ Lymphomas والذي يشمل Hodgkin's disease .

المناعة ونقل الأعضاء

عند نقل الأعضاء او الأنسجة يحاول الجسم التخلص منها ولكن يمكن الحد من هذا الرفض الى حد ما وذلك :

1- إجراء عمليات تنميط الأنسجة Tissue typing وهذه تجري لضمان ان الجزيئات الذاتية على سطوح الخلايا للمستلم مشابهة قدر الإمكان للجزيئات على سطوح خلايا الواهب .

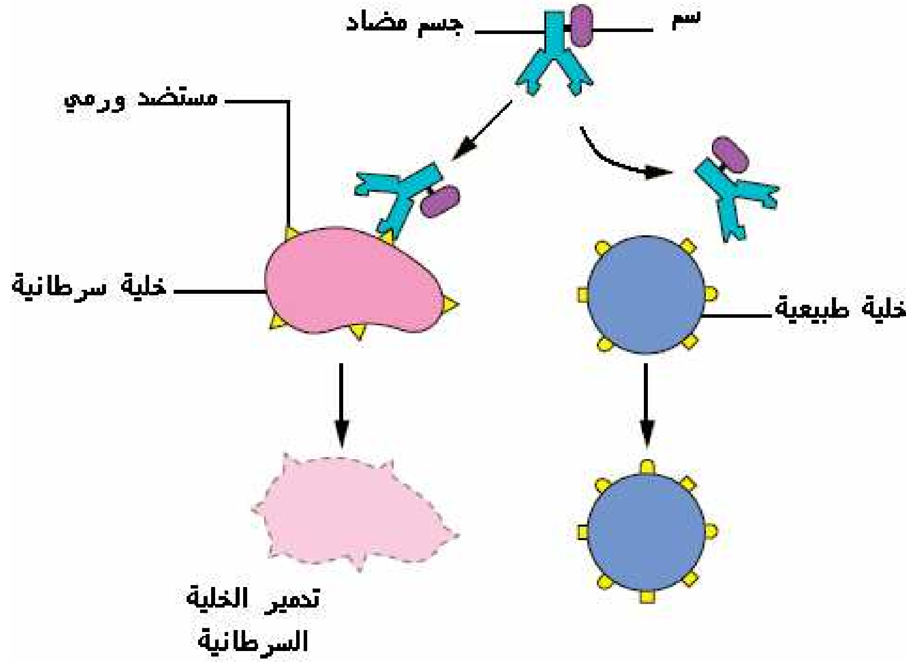
2- الطريقة الثانية محاولة تهدئة الجهاز المناعي للمستلم باستعمال الأدوية الكابتة للمناعة Immunosuppressive drugs مثل Cyclosporine A .

3- استعمال أجسام مضادة مصنعة خارج الأنظمة الحية لمهاجمة الخلايا التائية الناضجة .

المناعة والسرطان

عندما تتحول الخلايا الطبيعية الى خلايا سرطانية وتنفلت من دورة الخلية المنتظمة والمسيطر عليها (كما ذكر سابقا) فان هذا يؤدي الى تغير بعض المستضدات على سطحها ، وإذا لاحظ الجهاز المناعي هذه المستضدات الغريبة فانه يستثير دفاعات الجسم منها الخلايا التائية القاتلة والخلايا الأبتلاعية الكبيرة والخلايا القاتلة الطبيعية . ولكن الجهاز المناعي لا يمكن ان يفرض رقابة على كل الجسم والقضاء على كل الخلايا التي أصبحت سرطانية خاصة عند زيادة أعدادها ، لذلك تتطور هذه الأمراض عند عجز الجهاز المناعي . ولذا يحاول المختصون أيجاد أدوية لمثل هذه الحالات ومنها

استعمال محورات الاستجابة الحيوية ومنها الخلايا اللمفاوية واللمفوكاينات لتدعم الاستجابة المناعية للمريض وذلك بحقنها في بعض الأحيان مباشرة في جسم المريض . او تأخذ الخلايا اللمفاوية من المريض وتحول الى خلايا ورمية جائعة Tumor-hungry cells ثم يعاد حقنها في المريض لتهاجم الخلايا السرطانية ، ويمكن استعمال أجسام مضادة خاصة تستطيع تمييز بعض أنواع الخلايا السرطانية ، وتربط الأجسام المضادة مع الأدوية او السموم الفعالة وتحقن لتساعد في استهداف الخلايا السرطانية كما موضح في الشكل (20)



شكل 20 : استهداف الخلايا السرطانية بالأجسام المضادة

ويمكن ربط الأجسام المضادة المحضرة بمواد فعالة إشعاعيا لتتبع أعشاش او تجمعات الخلايا السرطانية عند حصول حالة تكوين النقائل او الانبثاث Metastases ، كما توجد ستراتيجيات أخرى مثل استعمال اللقاحات الوقائية لتنشيط الجهاز المناعي للتخلص من الخلايا السرطانية خاصة تحفيز الخلايا التائية القاتلة ضد الأورام ومثل هذه لا تكون كفوءة بحد ذاتها وإنما يمكن ان تستعمل مع علاجات أخرى .

المؤشرات المستعملة لقياس الفعالية المناعية

هناك عدة مؤشرات يمكن قياسها لتقدير فعالية الجهاز المناعي وقد تكون هذه داخل الجسم *In vivo* او خارج الجسم *In vitro* ومنها :

1- قياس المؤشرات خارج الجسم : وفي هذه الحالة تعزل الخلايا المناعية من الدم او الأنسجة اللمفاوية او من أنسجة القناة الهضمية ثم تحضر منها مزارع خلوية Cell cultures ويدرس تأثير المواد عليها :

ا- عملية الابتلاع Phagocytosis : وتقوم بها عادة الخلايا الأبتلاعية الكبيرة وتعد من الفعاليات المهمة في دفاعات الجسم وخاصة ضد الأحياء التي تدخل داخل الخلايا الأبتلاعية الكبيرة وتتكاثر فيها مثل *L. monocytogenes, Brucella* و *Mycobacterium tuberculosis* والفيروسات وغيرها . ولذلك فان تاثير الممرضات التي تدخل الخلايا تعتمد قابليتها للبقاء داخل الخلايا المبتلعة وفي هذا المجال استعملت بعض البكتريات لتقدير قابلية الابتلاع وقتلها من قبل الخلايا الأبتلاعية ومن البكتريات المستعملة *Staph. aureus* ، *E. coli* ، *Ps. aeruginosa* ، *Sal. typhimurium* ، *L. monocytogenes* ومن الخمائر *Candida albicans* وأثناء عملية الابتلاع ترتبط البكتريا الى مكونات المتمم ، والمعقد الناتج يرتبط الى مستلمات على سطوح الخلايا الأبتلاعية . ان عملية الابتلاع يمكن ان تتم بواسطة أجسام مضادة متخصصة تعمل كمواد طاهية Opsonins التي عند ارتباطها للجزيئات تجعلها عرضة لعملية الالتهام ، فعند ارتباط الجسم المضاد للبكتريا ينتج معقد يرتبط الى الخلايا الأبتلاعية عن طريق مستلم Fc (الجزء المهم في تركيبة الجسم المضاد) ثم تبدأ عملية الابتلاع . ولذلك تحضن الخلايا الأبتلاعية مع المواد القابلة للابتلاع مدة من الزمن وبظروف ملائمة مع المواد المراد الكشف عن قابليتها في التحفيز بوجود وعدم وجود المواد الطاهية ، ثم بعد ذلك تصبغ الخلايا لملاحظة التهامها للاجسام الغريبة .

ب – مقايسة تكاثر اللمفاويات Lymphocyte proliferation assay : اللمفاويات يمكن ان تحفز على الانقسام بعدد من المحفزات عند معاملتها لمدة معينة مثل استعمال المشطرات او المستضدات Mitogens ، ثم بعد ذلك تقاس قابليتها على التكاثر او قياس الفعالية السامة للخلايا وإطلاق جزيئات فعالة مناعيا مثل الأجسام المضادة او السايتوكينات وغيرها .

وفحص تكاثر اللمفاويات يعد من أكثر الطرق استعمالا لتقدير الاستجابة المناعية الخلوية وتسجل قدرتها على الاستجابة لإشارات التكاثر اذ يتم تحديد الاستجابة التكاثرية بتقدير عدد الخلايا في المزارع عند وجود او غياب العوامل المحفزة مثل المشطرات والمستضدات . وقلة او انخفاض التكاثر يحصل في الأمراض المزمنة مثل السرطان والإصابة بـ HIV وكذلك في الهرم وهذا يوضح اختلال فعالية المناعة الخلوية .

ومن أهم المشطرات المستعملة في هذا الفحص هو المشطر ألنباتي Concanavalin A (Con A) المستخلص من نوع من أنواع الفاصوليا تدعى فاصوليا جاك *Canavalia*

ensiformis ويتكون من 237 حامض أميني يحفز الخلايا التائية على الانشطار وكذلك يحفز الخلايا التائية السامة ويشجع إنتاج الانترلوكين IL-2 . والمشطر النباتي الاخر هو الراصة الدموية النباتية Phytohematoagglutinin المستخلص من الفاصوليا الحمراء او من بقوليات أخرى ، وهذا أيضا يحفز الخلايا التائية . أما الخلايا البائية فتحفز على الانشطار باستعمال السكريات المكوثرة الدهنية Lipopolysaccharides (LPS) . والخلايا البائية او التائية يمكن ان تحفز أيضا بالمشطر المستخرج من عشبة عنب الذئب Pokeweed mitogen وكذلك حبوب الطلع لعشبة الرجيد Rage weed . وعند قياس قابلية اللمفاويات على التكاثر تؤخذ من الشخص دون تعريضه المسبق للمستضدات او المشطرات وإنما تحضن مع المشطرات والمواد المراد فحصها أما أذا كان الهدف قياس قابلية مستضد معين فلا بد من تعريض الشخص للمستضد قبل تحفيز الخلايا بالمستضد خارج الجسم .

والخلايا اللمفاوية في الحالة الطبيعية توجد في الحالة Go وعند استعمال المشطرات تدخل الخلايا بسرعة الى مرحلة G1 وتستمر في مراحل دورة الخلية الأخرى ، وباستعمال طريقة اندماج الثايميدين المعلم $[^3H]$ thymidine في DNA في طور التخليق S ويمكن تقدير التغير في عدد الخلايا . وطريقة القياس الأخيرة هي أكثر الطرق استعمالا .

ج- فحص هجرة اللمفاويات Lymphocyte migration test

من الفحوص المناعية التي تجري خارج الجسم لتعيين وقياس المناعة الخلوية مثل قياس الحساسية المتأخرة ، وفيه تفصل الخلايا اللمفاوية من الدم وتركز بحدود 10^7 خلية \ مللتر وتعبأ في قطع من انابيب شعرية الى حد ثلثي طولها وتحضن الأنبوبة في وسط غذائي ملائم لزراعة ونمو الخلايا لليوم الثاني ، ففي الأوساط الطبيعية والحالات الطبيعية تهاجر الخلايا الى خارج الأنبوبة أما أذا احتوى الوسط على المستضدات فان الخلايا المنشطة او المحفزة عند تلامسها مع المستضد تتوقف عن الهجرة نتيجة لإفراز عامل مثبط للهجرة Migration inhibition factor فتبقى الخلايا داخل الأنبوبة .

د - قياس أنتاج السايتوكينات :

كما ذكر أنفا ان السايتوكينات وسائط بروتينية تنتج من خلايا الجهاز المناعي لغرض تنظيم فعالية الخلايا ونموها وتمايزها وكذلك لحث الالتهابات . وهناك عدة طرق لقياس إنتاج السايتوكينات مثل المقايسة الحيوية Bioassay والمقايسة المناعية ألشعاعية Radioimmunoassay والاختبار المناعي المرتبط بالأنزيم Enzyme- linked immunosorbent assay) ELISA، الاليزا) وغيرها . وهي طرق تستعمل لقياس الفعالية المناعية المختلفة . فمثلا يمكن قياس تكاثر الخلايا التائية السامة المعتمدة على IL-2 ، فتكاثر هذه الخلايا يعكس فعالية وكمية IL-2

وتقاس الفعالية بمعايرة النتائج (Calibration) مع منحنيات قياسية أعدت بإضافة تراكيز معينة من الانترلوكين المهندس وراثيا او الانترلوكين المأشوب Recombinant IL-2 وكذلك يمكن استعمال الاليزا لقياس كمية IL-2 .

ونظرا لأهمية IFN-γ فيتم أيضا قياسه ولكن بشكل غير مباشر أذ ان كمياته قليلة جدا ولذلك يقاس الانزيم المسؤول عن تخليقه 2'5'-A synthetase IFN-γ وعند ارتفاعه يعد دليلا على الاستجابات المناعية في الخلايا ، وذلك لان الانزيم من النوع المستحث بـ IFN-γ وقد وجد ان الانزيم يزداد الى سبعة أضعاف بعد المعاملة بالانترفيرون او المواد التي تحثه مثل الفيروسات وأشرطة RNAs المزدوجة التركيب .

هـ - قياس السمية الخلوية Cytotoxicity assay : ان الفعالية السامة للمفاويات التائية السامة Tc والخلايا القاتلة الطبيعية يمكن قياسها بقياس السمية الخلوية ، فالخلايا التائية تقتل الخلايا المستهدفة بعد التعرف على مستضدات موجودة على سطحها وبذلك فهي يمكن ان تحلل الخلايا الورمية والخلايا المصابة بالفيروسات . وعند قياس هذه الفعالية يمكن استخدام عدد من الخلايا كأهداف مثل خلايا مزارع نسيجية او خلايا سرطانية معلمة بالكروم المشع ^{51}Cr وتحضن مع الخلايا المنفذة او المؤثرة (أي الخلايا التائية المحفزة) مثلا بعد تحفيزها بالـ IL-2 ، وتتم بخلطها بنسب معينة وبعد ذلك يقاس الكروم المعلم الذي يعد دليلا على تحلل الخلايا المستهدفة والذي يعطي صورة عن الفعالية السمية للخلايا المنفذة وفعالية الأخيرة تعد من الاستجابات المهمة في الجسم ضد الأورام والإصابات الفيروسية

و - قياس التيارات السايتوبلازمية Flow Cytometric analysis : مثلما ذكر سابقا ان الخلايا المناعية تحوي مستضدات او واسمات خاصة على سطوحها وتستعمل هذه في التعرف وتشخيص الأنواع المختلفة من الخلايا مثل اللمفاويات والخلايا الأبتلاعية الكبيرة وكذلك التعرف على الأنواع الثانوية منها مثل الخلايا التائية والبائية . والأنواع الثانوية تلعب دورا مهما في تنظيم الاستجابة المناعية ، فالخلايا التائية (وكما ذكر سابقا) تقسم الى $CD4^+$ و $CD8^+$. والتي لها ادوار فلسجية محدودة فالـ $CD4^+$ هي خلايا تائية مساعدة أما $CD8^+$ تعمل كخلايا كابحة . وبتحديد الواسمات السطحية يمكن تحديد أنواع الخلايا ويمكن ان يؤدي الى فهم الاستجابة المناعية الخلوية .

وتعتمد طريقة استعمال التيارات السايتوبلازمية على صبغ الخلايا المنشطة بصبغة متفلورة لعزلها ، وتتم الطريقة :

1- تحضن الخلايا المحفزة مع أجسام مضادة متخصصة لبعض الواسمات على سطوحها وتكون الأجسام المضادة معلمة بصبغات متفلورة مثل Fluorescein isothiocyanate

2- تستعمل الخلايا المهيأة في الخطوة الأولى وتعزل وتعرف باستعمال Flow cytometry للحصول على المعلومات .

3- تحلل المعلومات الناتجة لغرض معرفة الأصناف الثانوية في الخلايا في النموذج من حيث كمية الأصناف الثانوية للخلايا وبالتالي معرفة نوعية الاستجابة المناعية في المضيف الذي اخذ منه النموذج .

2- قياس المؤشرات داخل الجسم

بالرغم من إمكانية قياس الفعاليات والوظائف خارج الجسم إلا انه لا بد من قياسها داخل الجسم الحي وذلك لأنه داخل جسم الكائن الحي تتوفر ظروف وعوامل لا تتوفر خارج الجسم ، وبالتالي فان القياس الناتج يكون أكثر دقة ومنها :

بالرغم من إمكانية قياس الفعاليات والوظائف خارج الجسم إلا انه لا بد من قياسها داخل الجسم الحي وذلك لأنه داخل جسم الكائن الحي تتوفر ظروف وعوامل لا تتوفر خارج الجسم ، وبالتالي فان القياس الناتج يكون أكثر دقة ومنها :

ا- قياس الابتلاع : لتنشيط عملية الابتلاع في الجسم له دور كبير في كبح الأورام والطريقة المستعملة داخل الكائن الحي تعتمد على تصفية Clearance مواد محقونة داخل الوريد مثل مواد غروية او بكتريا او جزيئات كبيرة او خلايا دم حمر مطهية او غيرها ، وبعد حقن المادة او المواد في داخل الوريد تسحب نماذج من الدم على مدد محدودة ، تحلل كريات الدم الحمر في النموذج وتقاس كمية المواد المحقونة بقياس الكثافة الضوئية Optical density .

ب- قياس الحساسية المفرطة المتأخرة Delayed-type hypersensitivity (DTH) :
يستعمل التفاعل بكثرة في فحوص داخل الجسم لتحديد الفعالية المناعية التي تشترك فيها الخلايا وكذلك يستعمل لقياس الاهلية المناعية Immunocompetence وقد وجد ان انخفاض الحساسية المفرطة المتاخرة مرتبطا بزيادة حالة الوفيات .

وتعتمد الطريقة على وجود مستضدات متخصصة على سطوح خلايا تائية يطلق عليها Tdh وعند تحضيرها تؤدي الى أطلاق لمفوكاينات وحصول تفاعلات التهابية تصل ذروتها بعد 24 -48 ساعة ولا تشارك فيها الأجسام المضادة ، ويجرى الفحص داخل الجلد بحقن كمية قليلة من المستضد المراد الكشف عنه داخل أدمة الجلد (Intradermal) . وعملية تحفيز Tdh تحتاج الى فعاليات الخلايا الأبتلاعية وخلايا لانكرهانس Langerhans في البشرة وتعتمد الفعاليات على جزيئات MHC II والانترلوكين IL-2 وبعد التنشيط تنطلق العديد من اللمفاوكينات كوسائط للالتهاب تؤدي الى تجمع خلايا الالتهاب في منطقة الحقن وتشمل التفاعلات أيضا عمليات انقسام الخلايا Blastogenesis (التكوين المأرمي) .

وتشارك في التفاعل الخلايا الأبتلاعية الكبيرة التي تقوم بتقديم المستضد وإطلاق IL-1 وTNF وكذلك إطلاق IL-2 وIFN-γ من الخلايا التائية المحفزة ومن تداخل هذه الوسائط المناعية تحصل الاستجابة الالتهابية ويمكن قياس منطقة احمرار الجلد حول منطقة حقن المستضد . وفي الفئران يمكن إجراء الفحص بحقن المستضد تحت جلد القدم ثم قياس انتفاخ القدم بعد مرور 24 ساعة

ج- قياس إنتاج الأجسام المضادة : ان عملية حث تخليق الأجسام المضادة بواسطة المستضدات تشمل عددا من الخطوات منها معالجة المضاد ثم تقديمه ، والتعرف على المستضد المقدم من قبل الخلايا التائية المساعدة Th1 التي تنشط به وتبدأ بإنتاج عددا من السايتوكينات التي تؤدي الى تحفيز وتضخيم استجابة خلايا الذاكرة البائية ، ولذلك فقياس كمية ونوعية الأجسام المضادة يعد مقياسا لاستجابة الخلايا البائية ومعاونة الخلايا التائية في ذلك .

علاقة الأحياء العلاجية بالجهاز المناعي

كما اتضح مما ذكر أنفا ان الجهاز المناعي يعمل بشكل شبكة متداخلة منظمة تعمل على منع الإصابات ونمو الخلايا غير المسيطر عليه لذلك يكون التأثير عليه متعدد الجوانب . وتحفيز الجهاز المناعي هي أحدى الآليات التي تعمل بها الاحياء العلاجية كما اثبتت ذلك عشرات بل مئات الدراسات إضافة الى التطبيقات الفطرية في الأرياف والمجتمعات البعيدة عن الحضارة المصطنعة ، فالجهاز المناعي بمرور الزمن تقبل الاحياء الموجودة في القناة الهضمية وتحور ليكون الخط الدفاعي الأول كما يتضح ذلك من الدراسات التي تستعمل فيها الحيوانات الخالية من الجراثيم Gnotobiotic والأخرى العادية . فمعاملة الحيوانات بالإحياء العلاجية يؤدي الى تقوية الحواجز المخاطية وتضخيم الاستجابة المناعية والآليتان تضفي الحماية بشكل متداخل ، ويعتقد العاملون في مجال صحة الحيوان ان الاحياء او البكتريا العلاجية تحسن الجهاز المناعي موضعيا على سطوح الطبقة المخاطية وكذلك على مستوى نظام الجسم فمثلا على ذلك فان إعطاء *Ent. faeciurn* للحيوان يؤدي الى خفض *Salmonella* في الطحال مما يشير الى استجابة جهازية . وفي الحيوان أيضا فان إعطاء *Lb. acidophilus* و *Lb. casei* عن طريق الفم يؤدي الى زيادة فعالية الالتهام للخلايا الأبتلاعية الكبيرة وكذلك فان إعطاء *Lb. bulgaricus* و *S. thermophilus* عن طريق الفم او داخل الصفاق Peritoneal ينشط فعالية الخلايا اللمفاوية .

إما التأثير الموضعي في الحيوانات فان إعطائها الاحياء العلاجية يؤدي الى زيادة تراكيز IgA المفرز في جوف الأمعاء مما يوفر خط دفاع ضد الاحياء المرضية مثل *Sal. typhimurium* وهذه الأدلة تشير الى ان الاحياء العلاجية تحور الجهاز المناعي في الحيوان .

وفي الإنسان يعتقد ان الاحياء العلاجية تضفي فعالياتها بالتفاعل مع Gut associated lymphoid tissue (GALT) في الامعاء والتي تحتوي على جيوب باير Peyer's patches

وهي موجودة ومنتشرة على جدران الامعاء الداخلية ومغطاة بخلايا متخصصة تعرف بالخلايا الميمية M-cells التي تسهل قبط المستضدات ، وقد وجد ان بكتريا حامض اللاكتيك تبحث عن هذه الخلايا في مناطق متخصصة من جيوب باير وترتبط إليها وتحفز المناعة الموضعية مؤدية الى إنتاج IFN-γ من الخلايا التائية γδT cells ، وهذا يؤدي الى زيادة تعداد الخلايا الميمية والذي يرافقه عملية تضخيم لازفاء البكتريا Bacterial translocation وبالتالي تنشيط أكثر للجهاز المناعي وزيادة المناعة الموضعية والجهازية . ويعتقد ان التحفيز المناعي في منطقة الامعاء يعود الى تأثير جدران الخلايا البكتيرية وهذا ما يوضح ان تماس الجهاز المناعي يكون من خلال هذه المساحات (جيوب باير) الموجودة في القناة الهضمية . وتأكيدا لذلك وجد ان الخلايا التي لها القابلية للالتصاق الى سطوح القناة الهضمية المخاطية هي التي تقوم بعملية التحفيز المناعي وعليه فان عملية الالتصاق وبالتالي تحفيز الجهاز المناعي تكون معتمدة على السلالة والنوع ، إذ ان الاختلاف في تركيب الجدران الخلوية تكون الأساس في اختلاف التأثيرات الناتجة . لذلك يلاحظ وجود خلاف حول إمكانية التحفيز بالخلايا الحية او الميتة ، فقد وجد في بعض السلالات ان الخلايا الميتة هي المسئولة عن التحفيز المناعي في حين في حالات أخرى كان يتوجب وجود خلايا حية . وبغض النظر عمن يقوم بعملية التحفيز فان عملية التحفيز تؤدي الى تحفيز المناعة غير المتخصصة و كذلك المتخصصة. ومثل هذه الشواهد تم الحصول عليها من الدراسات خارج النظام الحي وكذلك داخله مثل استعمال الحيوانات وكذلك الدراسات التي أجريت على الإنسان .

تأثير الاحياء العلاجية على المناعة الطبيعية

تؤثر البكتريا على المناعة الطبيعية او غير المتخصصة التي تعد خط الدفاع الأول وتشمل المنفذات الخلوية للخلايا المبتلعة وحيدة النواة والخلايا متعددة النوى PMNCs والخلايا القاتلة الطبيعة . فالدراسات الحيوانية أشارت الى زيادة فعالية الابتلاع وفعالية الخلايا القاتلة الطبيعية عند حقن العصيات اللبنية داخل الخلب . إما الإطعام الفموي بالإحياء العلاجية (بكتريا حامض اللاكتيك) فهو الأخر يزيد من فعالية الخلايا على الابتلاع وزيادة فعالية الخلايا القاتلة الطبيعية ضد الخلايا السرطانية في الفئران .

وأشارت الأغلبية العظمى من الدراسات الى ان تحفيز الفعالية في جميع الأحوال يعتمد على الجرعة ، فاستعمال حوالي 10^{11} من وحدات تكوين المستعمرات (cfu) يوميا من العصيات اللبنية يؤدي الى زيادة معنوية في عملية الالتهام في حين لا تحصل زيادة عند استعمال جرع اقل مثل 10^{7}-10^{9} / يوم .

إما الدراسات في الإنسان فقد وجد مثلا ان استهلاك 10^{9} من بكتريا *Lb. johnsonii* يؤدي الى زيادة فعالية الالتهام للخلايا المعزولة من الدم ، إضافة الى ذلك فان استهلاك اللبن التقليدي

المصنع عادة من *Lb. bulgaricus* و *S. thermophilus* يؤدي الى زيادة إعداد وفعالية الخلايا القاتلة الطبيعية ويزيد من الفعالية الالتهامية لخلايا الدم المحيطي الدائر Peripheral وزيادة مستوى IFN-γ .

كما ان إعطاء بكتريا حامض اللاكتيك بشكل أساسي او بشكل مساعد للادوية يؤدي الى زيادة الكلوبيولينات المناعية في سوائل الامعاء المصابة بالـ *Salmonella* إذ كانت هذه الأجسام المضادة متخصصة بالـ *Salmonella* . كما ان استهلاك اللبن او مستحضرات الاحياء العلاجية يؤدي الى زيادة استجابة الأغشية المخاطية (الموضعية) وكذلك الاستجابات الجهازية ضد سموم *Salmonella* والكوليرا *Vibrio cholerae* .

تأثير الاحياء العلاجية على المناعة الخلوية

الاحياء العلاجية وخاصة بكتريا حامض اللاكتيك تؤثر على ذراعي المناعة ألخلطي والخلوي . فتزداد فعالية الخلايا التائية ولعل أبرزها زيادة فعاليتها ضد *C. albicans* عند استعمال السلالة *Lactobacillus* GG المستعملة في العلاج على نطاق واسع وكذلك البكتريا المنشطرة *Bif. animalis* . وتتأثر الخلايا القاتلة بشكل كبير بالأحياء العلاجية فعد تناول الأشخاص للحليب المخمر او السجق Sausages الحاوي على الاحياء يؤدي الى زيادة فعالية الخلايا القاتلة الطبيعية على قتل الخلايا الورمية ، كما يؤدي الى زيادة نسبتها المئوية في الدم المحيطي للأشخاص المتبرعين للدراسة .

تأثير الاحياء العلاجية على مكونات الجهاز المناعي :

مثلما ذكر سابقا ان الجهاز المناعي متشعب جدا ومتداخل جدا ، وتؤثر الاحياء العلاجية بشكل يختلف من مكون الى آخر ، وفيما يلي ذكر لبعض هذه التأثيرات :

أ- **التأثير على الأجسام المضادة** : أكثر الدراسات أشارت الى ان استعمال الاحياء العلاجية مثل العصيات اللبنية GG والبكتريا المنشطرة يؤدي الى زيادة IgA ، وتكون هذه الأجسام متخصصة بالمستضد المعطى ففي حالة إعطاء *Sal. typhimurium* تكون الأجسام المضادة متخصصة لها. وكذلك تتولد IgA متخصصة بفيروسات الروتا Rotavirus المسببة للإسهال وضد الفيروسات السنجابية Poliovirus المسببة لشلل الأطفال ، كما ان هذه الاحياء تتكاثر وتظهر في غائط الأشخاص . فالأحياء العلاجية بعد عبورها العقبات التي تواجهها ووصولها الى تجويف القناة الهضمية وهذا يعني وصولها الى الأعضاء اللمفاوية للقناة وهناك يمكن ان تنشط الجهاز المناعي موضعيا والذي يؤدي الى إنتاج أجسام مضادة خاصة هي sIgA من خلايا جيوب باير PP cells ، وهذا النوع من الأجسام المضادة سهل الحث لذا يمكن حثه وزيادته بالتمنيع تحت الجلد او بإعطاء المحفزات عن طريق الفم . والأجسام المضادة المنتجة تمنع استعمار الامعاء من

قبل الاحياء الممرضة خاصة المسببة للإصابات المعوية وكذلك تمنع اختراق المستضدات الخطرة لجدران الامعاء .

ويؤدي إطعام البكتريات مثل *Lb. acidophilus , Lb. casei* الى زيادة إفراز sIgA وكذلك زيادة الخلايا المنتجة له في الامعاء الدقيقة بشكل يعتمد على الجرعة ، ويمكن حثه أيضا بإعطاء مكونات الخلايا بالنسبة للبكتريا *Bif. longum* بشكل مشابه لإعطاء الجدار الخلوي لبكتريا *Lb. acidophilus* ، إضافة الى ان النموذجين يؤديان الى ارتفاع IgG أيضا ان زيادة sIgA عند إعطاء خلايا *Lb. casei* فسر بأن البكتريا تؤدي الى تحفيز الخلايا في جيوب باير وتغير نسب الخلايا التائية المساعدة $CD4^+$ الى الخلايا المثبطة $CD8^+$.

ب - التأثير على السايتوكينات : أكثر السايتوكينات التي يزداد تركيزها هو IFN-γ إذ ان إعطاء اللبن المصنع من البكتريات الصناعية , *S. thermophilus Lb, bulgaricus* يؤدي الى إنتاج IFN-γ في الفئران الرضع وتقل القابلية على الإنتاج بتقدم العمر . وقد اقترح ان الفعالية المحفزة للمناعة عند إعطاء بكتريا حامض اللاكتيك فمويا يعود الى زيادة IFN-γ من خلايا جيوب باير في GALT ، ويزيد IFN-γ التعبير عن المكونات المفرزة وبذلك يلعب دورا مهما في نقل IgA ذات الوحدات المزدوجة . كما ان إعطاء بكتريات اللبن الرائب أيضا تؤدي الى تحفيز إنتاج IFN-β و IFN-α من قبل الخلايا متعددة النوى والخلايا التائية وزيادة تراكيزها في بلازما الدم . واستعمال بكتريا حامض اللاكتيك يزيد من إنتاج IL-12 الذي يعيد التوازن للخلايا التائية المساعدة Th2,Th1 الذي يقلل من أعراض الحساسية (كما سيأتي ذكره لاحقا)، وكذلك تعمل بعض السلالات على زيادة إنتاج IL- 4 من الخلايا المساعدة Th2 لتنظيم نسبة IgM الى IgE ، إضافة الى زيادة إنتاج IL-10 الذي يشجع انتاج الاجسام المضادة للـ IgE .

ان بكتريا اللبن التقليدي تزيد من انتاج IFN-γ في الفئران الصغيرة وتقل القابلية بتقدم العمر. وتساعد الاحياء العلاجية بصورة عامة على إطلاق سايتوكينات أخرى مثل ,IL-2, IL-1 . TNF- α , IL-18, IL-6 .

ج- التأثير على الخلايا المناعية : نظرا لقابلية الاحياء العلاجية في التأثير على وسائط المناعة فهذا يعني أنها تؤثر على الخلايا المناعية أيضا .

- التأثير على الخلايا الأبتلاعية : وهذه الخلايا تعد من الخطوط الأولى لدفاعات الجسم غير المتخصصة ضد الغزو البكتيري والأورام . فهي تقتل الخلايا الورمية بآليات تتضمن عدة خطوات منها :

1- إنتاج أوكسيد النتريك Nitric oxide وهو من العوامل الذائبة .

2- إنتاج بيركسيد الهيدروجين H_2O_2 .

3- إنتاج Superoxide O_2^- .

وقد وجد ان إعطاء الخلايا العلاجية يزيد من فعالية الخلايا االابتلاعية لخلايا الدم المحيطي مثل الخلايا وحيدة النواة والخلايا متعددة النوى . فعند إعطاء *Bif. lactis, Lb. johnsonii* لمدة ثلاثة أسابيع لأشخاص أصحاء أدى ذلك الى زيادة الفعالية الأبتلاعية لمدة عدة أسابيع بعد التوقف عن اخذ الاحياء العلاجية وكانت أكثر الخلايا تنشيطا هي المحببة وفاقت الخلايا وحيدة النواة . كما ان المستلمات المشتركة في عملية الابتلاع مثل CR1 , CR3 , Fc γR1 , R Fc α كلها زاد التعبير عنها في خلايا العدلات عند استعمال بكتريا حامض اللاكتيك . وهذا يعني زيادة معامل الابتلاع Phagocytic Index (PI) او منسب الابتلاع . وكذلك تزداد فعالية قتل الميكروبات من خلال زيادة فعالية Oxidative burst .

ومن الملاحظ ان كفاءة الابتلاع تقل بتقدم العمر لذلك فان استعمال اللبن او الاحياء العلاجية يمكن ان يصحح من انحدار كفاءة الخلايا على الابتلاع ، فعند إعطاء مجموعة من كبار السن حليب يحوي على *Bif. lactis* او *Lb. rhamnosus* مدة 3-6 أسابيع زادت لديهم خلايا الدم البيض القادرة على الابتلاع مثل العدلات وخلايا وحيدة النواة ، والاستجابة كانت مرتبطة بالعمر ، وكذلك زادت فعالية الخلايا القاتلة الطبيعية والاستجابة كانت مرتبطة بالعمر أيضا ، وفي الحالتين كانت الاستجابة لدى الأشخاص الأكثر من سبعين سنة أفضل .

ويمكن للخلايا استعمال آليات أخرى مثل الالتصاق بواسطة المستلمات لقتل الخلايا الورمية أي بالتماس المباشر بين الخلايا والجزء Fc γ من الكلوبيولين المناعي الموجود على سطح الخلية المبتلعة إذ يسهل ويساعد في الارتباط على الخلية الورمية المهيأة او المطهية (أي المغطاة بـ IgG) وبذا يسهل تسميم الخلية الورمية . وتساعد بكتريا حامض اللاكتيك في أداء هذه الفعاليات فقد وجد ان استعمال المنتجات الحاوية على *Bif. longum , Lb.casei , Lb. rhamnosus , Lb. acidophilus , Lb. helveticus* في الفئران أدى الى زيادة الفعالية الأبتلاعية للخلايا الابتلاعية الموجودة في الحويصلات Alveolar macrophages مقارنة بفئران أعطيت حليب معقم بالحرارة فقط . وتزيد السلالات من *Lb. acidophilus* و *Lb.casei* من الفعالية الأبتلاعية للخلايا الموجودة في الخلب إضافة الى تحفيزها إنتاج IFN-γ و IFN-α فضلا عن زيادة ملحوظة في كمية الأجسام المضادة .

ومن التأثيرات الأخرى فان إعطاء *Lb. casei* يؤدي الى زيادة نسبة الخلايا البائية ، ومن جهة أخرى يؤدي الى تغير نسب الخلايا التائية المساعدة ذات النمط المظهري $CD4^+$ الى $CD8^+$ المثبطة مما يحفز الخلايا في جيوب باير .

وتؤدي بكتريا حامض اللاكتيك الى زيادة فعالية الخلايا على التكاثر والاستجابة للمشطرات مثل Con A وLPS عند اختبارها بفحص تكاثر اللمفاويات . وعند استعمال سلالات محلية معزولة من أطفال رضع في مدينة بغداد وجد ان السلالات تساعد كثيرا في الأداء الوظيفي للخلايا المناعية وليست عملية التكاثر فقط .

ومن الفوائد الأخرى لبكتريا حامض اللاكتيك أنها تزيد من كفاءة التلقيح ، حيث تزيد sIgA عند الأشخاص الذين يستعملون لبن مخمر ببكتريا *Bif. bifidum* و *Lb. acidophilus* عند تمنيعهم ضد *Sal. typhi* وكانت الزيادة أربعة أضعاف مجموعة السيطرة . كما ان البكتريا تزيد من كفاءة التمنيع ضد فيروس شلل الأطفال فإعطاء البكتريا مع اللقاح يزيد من الأجسام المضادة الخاصة مثل IgG وIgA في مصل الدم والخاصة بالفيروس ، وكذلك تزداد الأجسام المضادة من نوع IgA الخاص بالفيروس في غائط الأطفال ، وهذا يعني ان لبعض سلالات بكتريا حامض اللاكتيك قابلية مساعدة قوية Potent adjuvant properties تمكنها من زيادة كفاءة اللقاحات الفموية .

وقد تكون فعاليتها ناتجة عن نقل المواد ذات الصفات المستضدية عبر جدران الامعاء وتحسين وظيفة الخلايا في تقديم المستضدات وكذلك تزيد من الجزيئات المحفزة التي تحث بالسايتوكينات الالتهابية الأولية Proinflammatory cytokines .

وبما ان الآليات ليست واضحة بشكل متكامل جدا لكن يعتقد أنها تعتمد على تفاعلات جزيئية مثل اشتراك الببتيدات و LAT وربما DNA مع نمط من المستلمات على سطوح الخلايا المناعية مثل الخلايا وحيدة النواة او الخلايا الأبتلاعية الكبيرة والخلايا الشجرية الموجودة في جيوب باير وجوف الامعاء ومواقع أخرى يمكن ان تحفز لإطلاق مجموعة من السايتوكينات التي تعمل في تنظيم المناعة .

ان التقنيات الجديدة المعتمدة على DNA والجزيئات الحيوية الأخرى توفر فرص كبيرة لمعرفة الآليات التي تعمل بها الاحياء العلاجية مثل التعرف على الإشارات الميكروبية التي تساعد في تقوية الحواجز المخاطية وتنظيم فعالية الطبقة المخاطية المناعية . كما يمكن هندسة بعض الاحياء العلاجية لتصبح بمواصفات خاصة لتعديل وتحوير الجهاز المناعي .

إنتاج البروتينات الغريبة ذات العلاقة بالمناعة في بكتريا حامض اللاكتيك

ان الاستعمال الشعبي والتقليدي لبكتريا حامض اللاكتيك هو الأغذية وهذا يؤكد أنها لا تولد الأمراض او الأعراض السلبية ولذلك كانت أهم الاحياء العلاجية . في ثمانينات القرن المنصرم

بدا الاهتمام بها لفهم الأسس الجزيئية لصفاتها خاصة التصنيعية للوصول الى السيطرة على عمليات التصنيع التي تشترك فيها . ومن جهة أخرى فإنها مهمة من ناحية التقنية الحيوية في مجالات أخرى وليس مجال الأغذية فقط منها الجوانب الطبية لذلك أجريت الدراسات العديدة والمستفيضة لفهم جوانبها الوراثية وتطوير النواقل ، إضافة الى دراسة تطوير أنظمة التعبير الجيني وأنظمة نقل وإفراز البروتينات . وهذا يعني الاستيضاح والمعرفة الشاملة لكل أجزاء الجينات فيها وممهداتها وتسلسلات الإشارة ليمكن تسخيرها لتطبيقات شتى . وابرز هذه التطبيقات هو إنتاج البروتينات الغريبة على الخلايا لتكون بمثابة مفاعلات حيوية Bioreactors لإنتاج هذه البروتينات سواء في الأغذية او استخدامها بشكل مباشر في القناة الهضمية للإنسان او الحيوان .

وأكثر هذه الجوانب إثارة هو استعمالها كنواقل لنقل اللقاحات Live delivery vectors لإيصالها الى الطبقة المخاطية في الامعاء التي تغطي الطبقة الطلائية والتي تكون أول الخطوط أمام المستضدات الداخلة ، وبذلك فهي تمثل الستراتيجية الملائمة للدفاع ضد الممرضات عند سطوحها ، وهذا قد لا يكون السبب الوحيد وإنما قد تكون هي الوسيلة الوحيدة لمنع الإصابات في بعض الأحيان ، ولذلك يكون من الأفضل غلق الإصابة ضد الميكروبات عند الطبقة المخاطية بدلا من معالجتها بعد حصول الإصابة ودخول بعضها الى الخلايا مثل الفيروسات وبعض الطفيليات وبعض البكتريا التي تدخل الى الخلايا .

فمن المعروف ان دخول الممرضات من المداخل التي هي بملامسة مع البيئة الخارجية مثل الفم وما يليه من القناة الهضمية او عن طريق الجهاز التنفسي او الجهاز التناسلي ، هذا النوع من الدخول يسمح للطبقة المخاطية بالتلامس مع المستضدات مما يؤدي الى إفراز sIgA بعد هجرة اللمفاويات الى الأنسجة اللمفاوية في الطبقة الطلائية المخاطية وهو القسم الرئيس من الأجسام المضادة التي تفرزها هذه الطبقة لمعادلة الممرضات وسمومها وبذلك يمكن التخلص من العديد من الأمراض .

وبكتريا حامض اللاكتيك مرشحة ان تكون وسائل لنقل المستضدات الخاصة إضافة الى ملائمتها لنقل الإنزيمات التي تنقص الجسم فهي تستطيع مقاومة الاجهادات في القناة الهضمية كما أنها تساعد في استثارة الجهاز المناعي ، إضافة الى ان جنس العصيات اللبنية يعمل كمساعد Adjuvant لتحفيز الجهاز المناعي ، لذلك كانت بكتريا حامض اللاكتيك ملائمة لنقل المستضدات وغيرها الى جسم الإنسان او الحيوان ، أي إضافة الاستعمالات الطبية الوقائية للاستعمالات العامة للبكتريا .

البيبتيدات الحيوية الفعالة Bioactive peptides :

مر فيما سبق ان الفوائد العلاجية من الاغذية المتخمرة او الاغذية الحاوية على الاحياء العلاجية لا يمكن ان تعزى بشكل مطلق للكائنات وحدها ، وهذا أدى الى الاختلاف في نصوص التعاريف التي وضعت لتعريف Probiotcs التي مرت في الفصل الأول من الكتاب . وذلك لان الفوائد يمكن ان تنتج من مواد الايض التي تنتجها الأحياء العلاجية ، والمواد التي تنتج من تاثير فعالياتها في الاغذية على وجه الخصوص ، ومنتجات الالبان تحتل الدرجة الاولى بين الاغذية لحمل الاحياء العلاجية وقد مر تبيان بعض هذه الجوانب في الفصول السابقة . والمناقشة الحالية تركز على البيبتيدات التي تنتج من تأثير الأحياء العلاجية والتي تكون فعالة في الأنظمة الحيوية .

والبيبتيدات الفعالة Bioactive peptides هي قطع خاصة من البروتينات التي تؤثر بشكل ايجابي على فعالية الجسم وبذا هي تكمل فعاليات الاحياء العلاجية التي كانت سببا في انتاجها والمحصلة النهائية هي إضفاء تأثيرات صحية ايجابية على المضيف .

وتكون البيبتيدات الفعالة مطمورة في تركيب بروتينات الحليب او انواع الغذاء الاخرى مثل الكازينات او بروتينات الشرش او غيرها . وتوجد هذه البروتينات في بروتينات اغذية اخرى كما ذكر مثل بروتينات الصويا والبومين الرز وغيرها من الخضر والمنتجات الزراعية وكذلك البروتينات الحيوانية ، ولكن لا تكون فعالة الا اذا أطلقت من البروتينات التي تحويها ، ثم بعد ذلك يمكن ان تساهم في العلاج الحيوي Probiosis لان لها تأثيرات تشبه الهرمونات .

وتتكون البيبتيدات الفعالة من عدد من الحوامض الامينية ابتدأ من 2 الى حوالي 20 منها او اكثر . وقبل الدخول الى طرق إطلاقها وفوائدها لابد من المرور على بعض مكونات الحليب الذي يعد اكثر المصادر احتواءا على البيبتيدات الفعالة .

بروتينات الحليب :

يعد الحليب مصدرا غنيا بالبروتينات والتي تكون ذات قيمة غذائية مهمة فهي توفر الحماية للجسم من جوانب مختلفة سواءا للأطفال او الكبار ، ومنها :

الكازينات : وتشكل 80 % من بروتينات الحليب الكلية وتصنف الى كازينات الفا α وبتا β وكابا K ، وكل من هذه البروتينات يحوي على عدد من البيبتيدات الفعالة التي يمكن ان تطلق بطرق مختلفة . ويحوي كازين الحليب على Proteose peptone وهي خليط من قطع البيبيتدات المقاومة للحرارة والذائبة في الحامض عند رقم هيدروجيني 4.6 ، وتمثل قطع مختلفة من الكازينات وهي القطع المرقمة f1-18, f29-105, f29-107, f105, f1-107 والتي تنتج من تاثير الانزيمات المحللة للبروتينات الموجودة في الحليب (أي الداخلية) . وتوجد مشتقات

اخرى للكازين مثل Glycomacropeptides والتي تنتج من الكازين كابا مثل f105-169 بتأثير الإنزيم Chymosin اثناء عمليات إنضاج الجبن .

بروتينات الشرش Whey proteins : بروتينات الشرش معقدة جدا وتساوي او تفوق بروتينات الغذاء المتوفرة في الكازينات او البومين البيض او بروتينات الصويا من حيث القيمة الغذائية . وهي التي تنتج بيبتيدات ذات المواصفات الدوائية التي تعد بروتينات الشرش اهم مصادرها ، وتؤدي أدوارا فسلجية مهمة في الجسم عند إعطائها عن طريق الفم ، ويحوي شرش حليب الأبقار (الذي يعد المصدر الرئيس للحليب) على 50 % من بروتين β – Lactoglobulin (β - LG) و 20 % من α – Lactalbumin (α- LA) و 12 % من بروتينات المصل Bovine serum albumin (BSA) ويحوي على الكلوبيولينات Ig المتمثلة بـ IgA , IgG , IgM بنسبة 8 % .

والبروتين β - LG يتكون من مركب مزدوج من β - LG A و β - LG B ويعمل في نقل فيتامين A ووظائف اخرى .

اما البرويتن α - LA فيرتبط بقوة بايون الكالسيوم ومعدل تفككه (K_d) 10 - 12 مول ، ويساهم في تخليق اللاكتوز .

اما بروتينات BSA , Ig فتكون مشابه لما موجود في الدم ، وبطبيعة الحال يكثر مستوى Ig أي تكوين الأجسام المضادة عند التهاب الضرع أي في Mastitic milk وكذلك في اللبأ Colostrum .

ويحوي الشرش على بروتينات اخرى ولكن بكميات اقل مثل Lactoperoxidase و Lactoferrins , Proteose peptone , Glycomacropeptides , Transferrins والبومين المصل .

فعالية البيبتيدات : بروتينات الحليب المذكورة أعلاه تحوي العديد من البيبتيدات التي تؤثر على التصرفات والتفاعلات العصبية والفسلجية والاستجابة الوعائية والمناعية وغيرها ، ويمكن للبيبتيد الواحد ان يؤدي اكثر من وظيفة وهي البيبتيدات التي تشترك بمظاهر تركيبية معينة وتواليات للحوامض الامينية المتداخلة ، وعليه فان إطعام البيبتيدات يمكن ان تظهر احد الفعاليات الاتية :

- بيبتيدات مضادة للأحياء المجهرية .
- بيبتيدات حاملة للمعادن .
- بعض البيبتيدات تكون مخدرة وأخرى تعاكسها في التأثير .
- بيبتيدات محورة للمناعة Immunomodulatory .
- بيبتيدات مضادة للتجلط Antithrombotic .

- ببيتيدات خافضة لضغط الدم Antihypertensive .
- ببيتيدات مضادة للأكسدة .
- ببيتيدات مضادة للتطفير .

اطلاق الببيتيدات : الببيتيدات تكون غير فعالة عندما تكون مطمورة في البروتينات التي تحويها ، وتكون بروتينات الحليب مثل كازينات بتا و Casein – α_{s1} وغيرها حساسة للبروتيزات ويمكن إطلاق الببيتيدات منها بأكثر من طريقة :

1 – عمليات التخمر .

2 – تصنيع الأغذية .

3 – التحلل بواسطة الإنزيمات الميكروبية والنباتية وغيرها .

عمليات التخمر : وهي الأهم من ناحية استعمال الاحياء العلاجية وخاصة بكتريا حامض اللاكتيك . فالحليب يحوي كميات محددة من الحوامض الامينية الحرة ولا يمكنها ان تدعم نمو البوادئ ، لذلك تقوم بكتريا حامض اللاكتيك بالاعتماد على أنظمة التحليل المعقدة لتحليل بروتينات الحليب وضمان نموها الأمثل ، وتتكون الأنظمة من :

- الانزيمات المحللة للبروتينات Proteinases الموجودة عند الغلاف الخارجي للخلايا وتقوم بتحليل بروتينات الحليب مثل الكازينات الى ببيتيدات قليلة التعدد Oligopeptides .
- انظمة لنقل الببيتيدات الناتجة الى داخل الخلايا .
- انزيمات محللة للببيتيدات Peptidases وهذه توجد عادة داخل الخلايا وتقوم بتحليل الببيتيدت الكبيرة الى ببيتيدات صغيرة وحوامض امينية لتستعمل من قبل الخلايا .

والجدول 10 يوضح بعض هذه الببيتيدات ومصادرها وتأثيراتها .

الببيتيد	المصدر ألبروتيني	فعالية الببيتيد
Casomorphins	كازينات الفا وكازينات بتا	ببيتيدات مخدرة
α- Lactorphin	α - Lactalbumin	ببيتيدات مخدرة
β - Lactorphin	β - Lactoglobulin	ببيتيدات مخدرة
Lactoferroxins	Lactoferrin	ببيتيدات مضادة للتخدير
Casoxins	كازين كابا	ببيتيدات مضادة للتخدير
Casokinins	كازينات الفا وكازينات بتا	مخفضة لضغط الدم
Lactokinins	α - Lactalbumin β – Lactoglobulin وبروتينات	مخفضة لضغط الدم

	المصل	
ببيتيدات مخفضة لضغط الدم	كازينات بتا	مخفضة لضغط الدم
ببيتيدات مناعية	كازينات الفا وكازينات بتا	ببيتيدات محورة للمناعة
Lactoferricin	اللاكتوفيرين	ببيتيدات مضادة للميكروبات
Casocidin	α_{s2} - Casein	ببيتيدات مضادة للميكروبات
Isracidin	α_{s1} - Casein	ببيتيدات مضادة للميكروبات
Casoplatelins	كازينات كابا	ببيتيدات مضادة للتجلط
ببيتيدات فوسفاتية	كازينات الفا وكازينات بتا	ببيتيدات رابطة للمعادن

الانزيمات المحللة للبروتينات : وهذه موجودة على غلاف الخلايا الخارجي كما ذكر أعلاه واغلب جيناتها بلازميدية . والانزيمات العائدة الى المكورات اللبنية تكون بمثابة بروتينات كبيرة تصل أوزانها الجزيئية الى 140000 كيلو دالتون ، والرقم الهيدروجيني الأمثل لعملها 5.5 – 6.5 . وتقسم الى عدة أقسام اعتمادا على مؤشرات عدة ، ومنها PI وهي التي تؤثر على كازينات بتا ، اما PIII فتكون فعالياتها على بروتينات اخرى مثل α_{s1} – Casein .

وتقوم الانزيمات بالتحليل منتجة 20 % من الببيتيدات الصغيرة يمكن نقلها وتستهلك من قبل المكورات اللبنية . وتكون العصيات اللبنية مثل *Lb. helveticus* و *Lb. delbrueckii* ssp *bulgaricus* اكثر فعالية في تحليل البروتينات من المكورات اللبنية .

وعند تخمر الحليب يلاحظ ازدياد محتواه من الببيتيدات بعد مرور 24 ساعة ، وعند النهاية يتوقف نمو الخلايا ولكن الانزيمات المحللة للبروتينات يستمر تأثيرها حتى عند انخفاض الأرقام الهيدروجينية ولكن يتوقف قبط الببيتيدات لان أنظمة النقل تتوقف عن العمل عند انخفاض الأرقام الهيدروجينية .

وتختلف الانزيمات في الاحياء العلاجية بين نوع ونوع وحتى بين سلالة وسلالة أي ان لكل كائن نمطا انزيميا معين Enzymogram خاص به ، مما يؤثر على نمط ونوعية الببيتيدات الناتجة وبذا يزداد تنوع الببيتيدات الناتجة ، ومن هذا المنطلق تساهم الانزيمات المحللة للبروتينات في الفعالية العلاجية .

الانزيمات المحللة للببيتيدات Peptidases : تنتج بكتريا حامض اللاكتيك انواعا منها Dipeptidases , Tripeptidases , Endopeptidases , Aminopeptidases .

فمثلا PepO هو من Endopeptidases يوجد داخل الخلايا وهو من الانزيمات الحاوية على المعادن ، يحلل البيبتيدات الصغيرة مثل Bradykinin (الموسع للأوعية الذي سيأتي ذكره لاحقا) .

PepX من Endopeptidases الذي يكون متخصصا في إطلاق البيبتيدات الحاوية على البرولين ومن Aminopeptidases التي تطلق الحوامض الامينية من النهاية الامينية للبيبتيد PepC , PepN التي لها تخصصا واسعا تجاه الأواصر البيبتيدية ، اما PepA فيكون متخصص لإطلاق ثمالات الكلوتامات من النهاية الامينية .

والملاحظ ان البيبتيدات الثنائية والثلاثية يمكن ان تنفلق بانزيمات متخصصة ولكن توجد انزيمات ذات مدى واسع من البيبتيدات التي تعمل عليها وتفلق كل البيبتيدات ما عدا الحاوية على البرولين ، وذلك لان وجود إنزيمات متخصصة بهذه البيتيدات تكون ضرورية للنمو الأمثل لبكتريا حامض اللاكتيك لان لها القابلية العالية على فلق بيبتدات الكازين الغنية بالبرولين . وتوجد انزيمات Proline aminopeptidases مثل PIp لفلق البيبتيدات الثنائية الحاوية على البرولين في النهاية الامينية اما PepI لفلق البيبتدات الثلاثية الحاوية على البرولين في النهاية الامينية .

نقل البيبتيدات : تنقل البيبتيدات الصغيرة وقليلة التعدد بأنظمة نقل خاصة Opp (Oligopeptide transport systems) ، فالبيبتيدات الثلاثية تنقل بـ DtpT (Tripeptide transport system) والثنائية تنقل بـ DtpD .

وأنظمة النقل Opp تتكون من عدة بروتينات ، اثنان منها ترتبط بـ ATP ، اما OppF , OppD فهي من بروتينات الغشاء الأساسية و OppA هو البروتين الذي يرتبط بمادة الأساس التي تنقل . إضافة الى وجود بروتينات اخرى OppC , OppB تؤدي وظائف معينة أثناء عملية النقل .

وفي الحقيقة ان نسبة ليست بالكبيرة من البيبتيدات هي التي تنقل الى داخل الخلايا اذ ان 25 % فقط من البيبتيدات الناتجة من تحلل الكازين هي التي تستعمل من قبل بكتريا حامض اللاكتيك ، اما الباقي فلا تشارك في نمو الخلايا لأنها لا تنقل الى داخل الخلايا . ويكون ذلك اعتمادا على حجم البيبتيد بشكل رئيس ، واغلب البيبتيدات التي تنقل تكون بحدود 11 حامض اميني ، ولو ان بعض أنواع البكتريا يمكن ان تنقل بيبتيدات مكونة من 18 حامض اميني ، ولذلك فان ما يتبقى في وسط التخمر (الحليب) يمثل مجمع البيبتيدات ذات الفعالية الحيوية . وتقوم البوادئ بتحليل البروتينات الى درجة معينة التي تؤدي الى إطلاق البيبتيدات الفعالة ، كما ان البيبتيدات يمكن ان تطلق بتأثير فعالية الفلورا الطبيعية .

وأفضل الطرق للحصول على تراكيز عالية من البيبتيدات الفعالة هو استعمال سلالات ذات فعالية عالية لتحليل البروتينات ولكن بنمط معين لان الفعالية الزائدة يمكن ان تدمر البيبنيدات الناتجة .

ومن جهة ثانية يلاحظ ان انزيمات تحليل البروتينات الميكروبية تكون متخصصة جدا مما يساعد في إطلاق بيبتيدات محددة فعالة جدا وكثيرة . كما ان هذه الانزيمات تؤثر على بروتينات الحليب قبل ان تؤثر عليها انزيمات الجهاز الهضمي والتي تتعرض لها بعد تناولها ، لذلك يلاحظ ان البيبتيدات الفعالة تكون أكثر إنتاجا عند هضم الألبان المتخمرة مقارنة باستهلاك الحليب العادي او غير المخمر مما يشير الى ان التخمر الميكروبي يكون مصدرا مهما للبيبتيدات الفعالة ، كما ان التخمر يوفر فرصة لتعريض الأواصر البيبتيدية لتأثير إنزيمات الجهاز الهضمي تكون غير متوفرة عند استعمال الحليب العادي مما يساعد في إنتاج بيبتيدات فعالة اخرى .

تصنيع الأغذية : تحصل تغيرات تركيبية وكيماوية لبروتينات الأغذية أثناء عمليات التصنيع والطبخ تؤدي الى إطلاق البيبتيدات الفعالة ، ومنها المعاملات الحرارية او المعاملات القلوية ، ولكن بعض هذه المعاملات يمكن ان تغير من نظائر الحوامض الامينية فيتغير بعضها من يسارية الدوران (L) الى النظائر اليمينية (D) وبالتالي تجعل البروتينات غير قابلة للتحلل او تمنع إمكانية هضمها ، وهذا ما يحصل أثناء تصنيع الحليب .

وفي اغلب الأحيان تؤدي المعاملات الى إطلاق البيبتيدات الفعالة والتي كانت غير فعالة في الحالة الطبيعية وعلى هذا الأساس يعتمد تحضير خلطات الأغذية مثل تلك التي تكون ذات قابلية واطئة لتوليد الحساسية Hypoallergenic التي تعد للأطفال الرضع او لأغراض سريرية .

التحلل الانزيمي : ان فلق بروتينات الحليب بواسطة بعض الانزيمات مثل الببسين وانزيمات البنكرياس مثل التربسين و Chymotrypsin , Carboxypeptidases , Aminopeptidases تؤدي الى إطلاق البيبتيدات الفعالة في القناة الهضمية .

وفعالية البيبتيدات الفسلجية تعتمد على وصولها وتداخلها مع المواقع المستهدفة والذي يمكن ان يتضمن امتصاصها من قبل الطبقة الطلائية للأمعاء قبل الوصول الى الأعضاء الاخرى او المواقع التي تمارس فيها فعالياتها .

وقد أمكن تحضير العديد من البيبتيدات الفعالة خارج الجسم باستعمال انزيمات الجهاز الهضمي مثل الببسين والتربسين ، او من استعمال الانزيمات من مصادر مختلفة مثل البكتريا والفطريات ومن بروتينات مختلفة المصادر .

فمثلا البيبتيدات المخفضة لضغط الدم أي المثبطة لإنزيم ACE (الذي سيأتي ذكره لاحقا) والبيبتيدات الحاوية على الفوسفات الربطة للكالسيوم CPPs يمكن الحصول عليها من معاملة البروتينات بالتربسين . وعليه فان بروتينات الحليب الوافرة وباستعمال الطرق المختلفة يمكنها إطلاق البيبتيدات التي تقرب من 20000 من البيبتيدات المختلفة .

والبيتيدات الفعالة يمكن ان تثبط الانزيمات المحللة للبروتينات العائدة الى بكتريا حامض اللاكتيك ، ولذلك يمكن الحصول عليها في أوقات مبكرة من التخمر او عمليات انضاج الجبن . والبيبتيدات تعمل بآلية متشابه مثل عند إظهارها للفعل المحفز للمناعة او مضادة التجلط او خفض ضغط الدم او غيرها من الفعاليات تكون مشابه للآليات المستعملة لتثبيط الانزيمات المحللة للبروتينات . وقد عزل العديد من البيبتيدات المختلفة من الجبن والتي تتصف بانها مثبطة لانزيمات تحليل البيبتيدات Peptidases الموجودة داخل خلايا بكتريا حامض اللاكتيك .

وفيما يلي ذكر لبعض تأثيرات البيبتيدات الفعالة :

البيبتيدات المضادة للميكروبات : يحوي الحليب عددا من الوسائل الدفاعية ومنها البيبتيدات ، اذ يؤثر الحليب في الأحياء المجهرية بواسطة بروتينات دفاعية من الكلوبيولينات وبروتينات اخرى تتآزر فيما بينها لإعطاء تأثير اكبر ، ويحوي على البيبتيدات القاتلة للبكتريا التي تتحرر من البروتينات التي تمثل الطلائع .

ومن البروتينات الدفاعية Lactoferrin وبعض البيبتيدات السكرية التي تؤثر في البكتريا *Staph. aureus* و *Streptococcus* ولكن انتاج هذه المواد كمضادات للميكروبات لم يحظى بالدراسات الموسعة والتطبيق الإنتاجي ، ولكن في الوقت الحاضر تتجدد الاهتمام بها في مجال صناع الاغذية الصحية .

Lactoferricin B : من البيبتيدات المشتقة من الطرف الاميني للاكتوفيرين باستعمال الببسين ويمثل القطعة (f17-41) من اللاكتوفيرين ، ويؤثر في مجموعة البكتريا الموجبة لصبغة كرام مثل *Listeria* وجنس العصيات والمكورات العنقودية والمكورات المسبحية . كما انه يؤثر في البكتريا السالبة لصبغة كرام مثل *E. coli* O157H:7 و *E. coli* 0111 و , *Pseudomonas* , *Klebsiella* , *Salmonella* , *Proteus* ويؤثر في مجموعة من الفطريات والخمائر مثل *Cryptococcus uniguttulatus* و *Candida albicans* والفطريات الجلدية مثل *Trichophyton metagrophytes* و *Pen. pinophilum* . ويقوم بقتل الأحياء بواسطة زيادة نضوحية الاغشية الخلوية ، كما ان قابليته في القتل تعتمد على صافي الشحنة الموجبة التي تظهر على البيبتيد وتتأثر فعاليته عند زيادة المخاط في خليط التفاعل . ويزيد البيبتيد من فعالية الأدوية ضد الفطريات والخمائر كما في خلطه مع مركب Azole لمكافحة الخميرة *C. albicans* المقاومة للأدوية .

ومثلما ذكره اعلاه ان البيبتيد ينتج من تأثير الببسين في بروتين اللاكتوفيرين لذلك تنتج هذه البيبتيدات عند تناول الحليب الحاوي على اللاكتوفيرين .

Israсidin : ببتيد ينتج من معاملة الكازين **α_{s1}** بانزيمات Chymosin والانزيم Chymotrypsin ويمثل القطعة (f1-23) من الكازين المذكور ، ويؤثر في البكتريا *Staph. aureus* والخميرة *C. albicans* . ويساعد في حماية الفئران ضد الممرضات ، كما انه يوفر الحماية للأبقار والأغنام ضد التهاب الضرع عند حقنه في الضرع بمستويات تكافئ المضادات الحيوية المستعملة

Casecidin : ببتيد بوزن جزيئي 4000 – 6000 يتم الحصول عليه من تأثير الهضم بالـ Chymosin او Chymotrypsin للكازين كابا والالفا **α_{s1}** عند أرقام هيدروجينية متعادلة وهو من البيبتيدات الاولى التي تم تنقيتها ، ويظهر قابلية قاتلة للعديد من البكتريا الموجبة لصبغة كرام مثل *S. pneumoniae , S. pyogenes , Staphylococcus , Sarcina , B. subtilis* .

ويوجد ببتيد Casecidin I الذي يشتق من حليب الأبقار من الكازين **α_{s2}** ويمثل التوالي (f165-203) ، ويمكن ان يحضر صناعيا . يؤثر في البكتريا *Staph. carnosus* و *E. coli* .

وبصورة عامة يعتمد MICs على الكائن المجهري المستهدف ويمكن ان تتراوح بين 8-95 مايكرومول

البيبتيدات الرابطة للمعادن : وتتمثل هذه بالبيبتيدات الفوسفاتية وبصورة اخص بيبتيدات الكازين الفوسفاتية Caseinophosphopeptides (CPPs) تنتنج من معاملة الكازينات الفا α_{s1} و α_{s2} وكذلك كازين بتا وكابا عند المعاملة بانزيم التربسين ، وترتبط الفوسفات فيها الى الحامض الاميني السيرين وتكون بشكل أسترات أحادية او تجمعات وقد ترتبط الفوسفات الى حامض الكلوتاميك ، ويكون هناك اختلافا في درجة فسفرتها والذي يؤثر على قابلية ارتباطها الى المعادن ، وتظهر البيبتيدات المشتقة من α_{s2} الفعالية الأكبر تليها α_{s1} ثم تليها بيبتيدات بتا وكاما ، وتوزيع ثمالات السيرين المفسفرة لا يكون موحدا بالنسبة للبيبتيدات المذكورة ، ويؤثر تسلسل الحوامض الامينية فيها على قابليتها للارتباط بالكالسيوم .

تكون البيبتيدات أملاح فوسفاتية عضوية ذائبة وتقاوم الهضم بانزيمات القناة الهضمية ، وتوجد عادة على شكل معقدات مع فوسفات الكالسيوم وتكوين هذه المعقدات يزيد من قابلية الذوبان وبالتالي يزيد من قابلية امتصاص الكالسيوم في الأمعاء الدقيقة ولذلك يساعد الحليب في منع اضطرابات تكلس العظام بمنعه ترسب الكالسيوم في الجزء الأسفل من أللفائفي .

والنهاية المشحونة للبيبتيدات وبشكل خاص الفوسفات المرتبطة للحوامض الامينية يمكن ان ترتبط الى معادن أخرى غير الكالسيوم مثل Zn , Fe , Mg . وتوجد هذه البيبتيدات تطبيقات علاجية عدة ، فهي ونتيجة لقابليتها على الارتباط الى المعادن يمكن ان تمنع ترقق او هشاشة العظام Osteoporosis وكذلك تمنع ارتفاع ضغط الدم ، كما انها تمنع تسوس الأسنان وحصول Caries

lesions من خلال إعادة تكلس Recalcification لمينا الاسنان Dental enamel لذلك تستعمل في علاج الأسنان ويكون ذلك بمساعدة البيبتيدات السكرية Glycomacropeptides (GMP) المشتقة من الكازين كابا ، وتعمل على منع تسوس الاسنان بمنع التصاق ونمو البكتريا (Plaque – forming bacteria) على الطبقة المخاطية في الفم ، وتوجد مستحضرات خاصة للعناية بالأسنان حاوية على CPPs , GMP .

البيبتيدات المخدرة Opioid peptides : مجال تأثير البيبتيدات هو الجهاز العصبي وتوجد في بروتينات حليب الإنسان والأبقار وتشتق من بروتينات الحليب المختلفة وتوجد أنواع تضادها في التأثير ، والجدول 11 يوضح أهم هذه البيبتيدات ومواقعها في بروتينات الحليب .

وتنتج البيبتيدات(كما موضح في الجدول) من تأثير الانزيمات او تأثير الانزيمات المحللة للبروتينات من بكتريا حامض اللاكتيك وكذلك تنتج عند نمو البكتريا *B. subtilis* , *Ps. aeruginosa* . وعند دخول البيبتيدات الى الجهاز الهضمي تمتص الى الدم وتذهب الى الدماغ والأعضاء الأخرى مؤدية الى تأثير يشبه المورفين Morphine او Opium ، ولذلك يلاحظ ان المواليد عند شربهم للحليب يصبحون هادئين ويمكن ان يدخلوا الى النوم . وتتداخل البيبيتدات مع المستلمات **μ** او **δ** او **κ** الموجودة على الخلايا العصبية او جهاز الغدد الصم Endocrine وكذلك الجهاز المناعي والقناة الهضمية ، ومن هذه البيبتيدات :

جدول 11 : أهم البيبتيدات المخدرة والمضادة للتخدير المجودة في بروتينات الحليب

البيبتيد الفعال	توالي الحوامض الامينية في البروتين	مصدر الانزيمات المحررة للبيبتيدات
البيبتيدات المخدرة		
β-casomorphin - 4	β –casein (f60-63)	بروتيزات بكتريا حامض اللاكتيك
β-casomorphin – 5	β –casein(f60-64)	Chyme
β-casomorphin - 7	β –casein(f60-66)	Chyme
β-casomorphin - 11	β –casein(f60-70)	Chyme
Exorphin	αs_1 (f90-96)	Pepsin
α - lactorphin	α- lactalbumin(f50-53)	Trypsin
β-lactorphin	β-lactoglobulin (f102-105)	Trypsin

البيبتيدات المضادة للتخدير		
Lactoferroxin A	Lactoferrin (f318-323)	Pepsin
Casoxin A	κ –casein (f25-34)	Trypsin
Casoxin B	κ –casein(f35-41)	Trypsin
Casoxin C	κ –casein(f57-60)	Trypsin
Casoxin D	κ –casein (158-164)	Pepsin – chymotrypsin

المورفينات الكازينية β- casomorphins ويوجد منها أكثر من بيبتيد كما موضح في الجدول وتشغل البيبتيدات المواقع (f60-70) وتعرف هذه بالمنطقة الإستراتيجية لانها تكون محمية من التحلل ألبروتيني بالإنزيمات وذلك لأنها ذات كراهية عالية للماء وكثرة وجود البرولين . تتداخل البيبتيدات مع المستلمات من نوع **μ** .

وتمتاز البيبتيدات المخدرة بتركيب خاص يسهل تداخلها مع المستلمات ، ومعظمها يمتاز بوجود ثمالة التايروسين عند النهاية الامينية ، يليه البرولين وحامض حلقي اخر ويكون عادة التايروسين او الفنيل – النين في الموقع الثالث والرابع . وإزالة التايروسين يؤدي الى فقدان البيبتيد لفعاليته ، اما وجود البرولين فهو للمحافظة على ترتيب الثمالات الاخرى . وقد اكتشف تأثيرها عند استعمال العقار Naloxone الذي يكون مضادا لمستلمات المخدرات ، فعند المعاملة ينتفي تأثير البيبتيدات .

ولهذه المجموعة من البيبتيدات تأثيرات أخرى غير مهمة التخدير او تغيير تصرفات الشخص ومنها :

- ◊ البيبتيدات التي تنشا في حليب النساء يمكن ان تؤثر على إطلاق هرمونات Oxytocin , Prolactin
- ◊ تطيل من بقاء الغذاء في الأمعاء بتأثيرها على الحركة الدودية للأمعاء مما يؤدي الى زيادة الفرصة لامتصاص المواد الغذائية .
- ◊ وتؤثر المورفينات الكازينية بشكل مضاد للإفراز وتؤثر في حركة الالكتروليتات ولذلك تستعمل في علاج الإسهال أي انها تعمل مضادات للإسهال . وفي هذا المجال لا يعود السبب الى التأثير المخدر وإنما يعود الى ان المورفينات الكازينية لها تراكيبها الخاصة (المذكورة اعلاه) وصفاتها الفيزوكيماوية والتي تمكنها من التداخل مع مواقع سيطرة مختلفة مثل المستلمات الملائمة لهذه البيبتيدات على Brush border membrane في الأمعاء يؤدي الى التأثير على

نقل السوائل والالكتروليتات ولذلك تؤثر في حالة الإسهال وتستعمل بدلا من الإرواء الفموي لمعالجة الإسهال ، اضافة الى إبطائها حركة الامعاء .

◊ تؤثر في عمليات نقل الحوامض الامينية في الأمعاء .

◊ تؤثر في إفراز الغدد الصم مثل التأثير على إفراز الأنسولين ومشتقات هرمون النمو (Somatostatin) .

◊ تؤثر على الشهية للطعام وذلك بتأثيرها على فعالية البنكرياس بزيادة إفراز الأنسولين

◊ تزيد من قبط الدهون كما وجد من زيادة وزن الجرذان ، ولكن هذه تواجه بتأثير Enterostatin كما يعمل العقار Naloxone الذي يعاكس تأثير المواد المخدرة وذلك بحصول التنافس بين المورفينات الكازينية و Enterostatin على المستلمات التي تؤثر في قبط الغذاء .

◊ تساعد في تسكين الآلام (Analgesic activity) .

ومن المورفينات المذكورة في الجدول 4 - β-casomorphin والذي يسمى Morphiceptin والبيبتيد يعد مهما جدا نظرا لقوة ارتباطه بالمستلمات **μ** والذي يشغل القطعة (f60-63) بتوالي للحوامض الامينية Tyr-Pro-Phe-Pro ويكون البرولين أساسي للفعالية اضافة الى محافظته على ترتيب (Orientation) كل من التايروسين والفنيل- النين .

α- casomorphins : تشتق من الكازين الفا α_{s1} وهو من البيبتيدات التي تقاوم انزيمات القناة الهضمية وتبقى فيها لذلك يعتقد ان تاثيرها يكون في تلك المنطقة وذلك لانه عند دخولها مجرى الدم يتم تدميرها بسرعة .

Exorphins من البيبتيدات المخدرة وهذه تمثل مجموعة تشتق من الكازين α_{s1} تتكون من بيبتيدات منفصلة وهي بالتوالي f90-95 , f90-96 , f91-96 ، وتختلف عن المورفينات الكازينية المذكورة أعلاه بأنها ترتبط الى المستلمات من نوع **δ** .

بيبتيدات اخرى : ومنها α- lactorphin الذي يشتق من البروتين α- lactalbumin ويمثل القطعة (f50-53) ويمكن ان يشتق من الحليب ألبقري والبشري . والبيبتيد β- lactorphin الذي يشتق من البروتين β- lactoglobulin (f102-105) .

ومن البيبتيدات الاخرى Serophin الذي يشتق من ألبومين المصل ويمثل القطعة (f399-404) ، وكذلك بيبتيدات β-endorphins .

البيبتيدات المضادة للتخدير Opioid antagonist : وهذه تنتج عادة من كازين كابا بشكل رئيس والتي يمكن ان تمنع تأثير المواد المشابه للمورفين ، وتؤثر على المستلمات **κ** و **μ** وتكون نهايتها

الكاربوكسيلية حاوية على مجموعة المثيل وتسمى بشكل عام Casoxins ، ويوجد منها انواع كما موضح في الجدول (11) . والانواع A , B , C تشتق من الكازين كابا ، اما النوع D فيمكن ان يشتق من α_{s1} ويعمل على منع تقلص أللفائفي ويوسع الأوعية الدموية ويشتق من الحليب البشري .

ومن البيبتيدات المضادة للتخدير الاخرى هي البيبتيدات المشتقة من اللاكتوفيرين وتسمى Lactoferroxins منها انواع مثل A الذي يمثل القطعة (f318-323) ، اما B فيمثل القطعة f536-540 والنوع C (f673-679) تشتق من اللاكتوفيرين البشري وتشابه تأثير Naloxone .

والبيبتيد A يفضل الارتباط الى المستلم μ اما B , C فتضل الارتباط الى المستلم κ .

وتوجد انواع محورة كيماويا وتكون فعاليتها اكبر وهي لا توجد في الأنظمة الطبيعية .

البيبتيدات المحورة للمناعة : من المتوقع ان يكون الجهاز المناعي أكثر المجالات تأثرا بالبيبتيدات وغيرها من المكونات وذلك لتشعب الجهاز وكثرة عناصره وتداخل مكوناته في شبكات معقدة في العمل ، كما انه بهذه المواصفات سيكون عرضة للتأثر ببيبتيدات تعمل بشكل واضح ومباشر في مجالات اخرى ولكنها تتداخل مع الجهاز المناعي بشكل غير مباشر .

وقد تم إيضاح بعض جوانب هذا الجهاز المهم سابقا . وتؤثر البيبتيدات عند تحويرها للجهاز المناعي على المكونات والاستجابات ، ويمكن إجمال الدراسات والبحوث العديدة التي أجريت في هذا المجال ان تأثير البيبتيدات يكون :

- زيادة تكاثر اللمفاويات في الإنسان مثلا .
- زيادة قابلية الابتلاع من قبل الخلايا المدافعة .
- زيادة تخليق الأجسام المضادة .
- التقليل من أعراض الحساسية بعمل الموازنة بين Th1 , Th2 .
- تنشيط المقاومة في القناة الهضمية .

فمثلا البيبتيد Lactoferricin B الذي هو مضادا للميكروبات يكون تأثيره من خلال الجهاز المناعي اذ يزيد من القابلية الابتلاعية لخلايا العدلات البشرية بواسطة الارتباط المباشر او العمل بطريق Opsonin – like ، ومن تأثيراته إحباط إنتاج IL- 6 من خلايا وحيدات النواة البشرية عند تحفيزه بـ LPS ، في حين يحفز انتاج IL- 8 من الخلايا PMNCs البشرية .

وتزيد متحللات الكازين من القابلية الابتلاعية للخلايا Macrophages في الانسان تجاه خلايا الدم الحمر القديمة وبكتريا *K. pneumoniae* .

اما البيبتيد الثنائي للنهاية الامينية للبروتين α- lactalbumin البقري والبيبتيد الثلاثي للنهاية الامينية للكازين كابا فهي تزيد من قابلية تكاثر اللمفاويات في الدم البشري المحيطي ، في حين ان النهاية الكاربوكيسلية تزيد هذه الفعالية في الجرذان .

وعند تخمير الكازين كابا وتعريضه لفعل السلالة *Lactobacillus* GG ثم معاملة الناتج بالببسين والتربسين كانت النواتج محفزة لاستجابة الخلايا اللمفاوية البشرية للمشطرات ، كما ان البيبتيدات الناتجة من تأثير البكتريا *Lb. helveticus* تؤثر وتزيد من تكاثر لمفاويات الدم المحيطي البشري .

البيبتيدات الكازينية المحورة للمناعة : بالرغم من ان بروتينات الحليب كلها يمكن ان تحوي على بيبتيدات محورة للمناعة الا ان هناك تواليات محددة من الكازينات تكون لها فعالية تحوير المناعة ومنها κ–caseinoglycopeptides (CGP) والناتجة من هضم كازين كابا بالكايموسين تقوم بتحوير المناعة بشكل سلبي بإحباطها تكاثر اللمفاويات في طحال الفئران المحفزة بـ LPS او الراصة النباتية الدموية Phytoagglutinin . ولكن من جهة ثانية فان بروتينات كابا تحوي على بيبتيدات تحفز المناعة مثل البيبتيد الثنائي Tyr-Gly الذي يؤدي الى زيادة تكاثر الخلايا اللمفاوية لدم الإنسان المنشطة بـ ConA ، ونظرا لصغر البيبتيد فانه يمكن ان يعبر الأمعاء بكميات كبيرة ليصل الى اللمفاويات القريبة في المنطقة .

والكازين كابا المحلل بانزيمات الببسين والتربسين يزيد من انتاج IL - 4 , IFN – γ ، اما المحلل بواسطة السلالة GG فانه يقلل من انتاج IL - 4 دون التأثير على IFN – γ .

ويمكن ان تنطلق البيبتيدات المحورة عند معاملة بيبتيدات اكبر مثل البيبتيد السداسي Val-Glu-Pro-Ile-Pro-Tyr المشتق من الكازين البشري والنواتج تزيد من قابلية الابتلاع خارج الجسم الحي اما حقنه بالوريد للفئران فيؤدي الى زيادة مقاومتها للاصابة بـ *K. pneumoniae* . اما البيبتيد السداسي Thr-Thr-Mrt-Pro-Leu-Tyr الذي ينطلق من معاملة α_{s1} فانه يقلل أيضا من اصابة الفئران بـ*K. pneumoniae* وزيادة إنتاج الأجسام المضادة ، إضافة الى تأثيره على الخلايا اللمفاوية في الطحال وجيوب باير في القناة الهضمية .

البيبتيدات المحورة للمناعة من بروتينات الحليب الثانوية : تحوي بروتينات الشرش واللاكتوفيرين على بيبتيدات قادرة على تحوير المناعة وتحفيزها .

فعند هضم اللاكتوفيرين بالببسين تنتج بيبتيدات لها تأثيرات على مكونات الجهاز المناعي مثل زيادة القابلية الابتلاعية للعدلات البشرية . وهضم بروتين الشرش α- lactalbumin بواسطة التربسين فانه ينتج بيبتيدات تزيد من التحمل الفموي للفئران إضافة الى زيادة الاستجابة الخلطية

بتحوير فعالية الخلايا البائية والخلايا التائية المساعدة . والمستحضرات من البروتين الأخير تحفز الخلايا البائية عند غياب تعاونها مع الخلايا التائية أي بتحسين الاستجابة غير المعتمدة على الخلايا التائية .

التأثيرات غير المباشرة : هناك بعض البيبتيدات التي تحفز المناعة بطريق غير مباشر مثل البيبتيدات المخدرة β-endorphins تساعد في زيادة تكاثر اللمفاويات وكذلك زيادة فعالية الخلايا القاتلة الطبيعية وزيادة حركة العدلات ، وهذا يمكن ان يفسر على انه ناتجا من ان هذه الخلايا تحوي على مستلمات **μ** على سطوحها .

وهناك تاثير مشابه للـ β – casokinis وهي من مخفضات ضغط الدم (التي سيأتي ذكرها لاحقا) وتخفض من هرمون Aldosterone الذي يؤثر على Bradykinin (وهو هرمون موسع للأوعية) وله تأثيرات محفزة للمناعة وذلك بتحفيزها الخلايا الابتلاعية الكبيرة ، كما انها تحفز هجرة اللمفاويات وزيادة إنتاجها للـ Lymphokines ، وكل هذه الفعاليات تتداخل لتحفز الجهاز المناعي .

تاثير البيبتيدات على نمو الاورام : من خلال تأثير بكتريا حامض اللاكتيك والبيبتيدات الفعالة على الجهاز المناعي فهي يمكن ان تؤثر في بعض الأورام .

فتخمير الحليب بالبكتريا *Lb. helveticus* R389 يؤدي الى زيادة انتاج IgA عند تناول المنتج ويؤدي أيضا الى زيادة الخلايا البائية في الأمعاء والأنسجة والقصبة الهوائية ، ومثل هذه الفعاليات لم يتم ملاحظتها عند استعمال سلالات غير محللة للبروتينات ، ويعتقد ان تقليل تدمير الأنسجة أثناء الاستجابة الالتهابية الدائمة التي تحدث عند تطور الأورام هي السبب في تقليل تطور الأورام ، ويعمل IgA كأحد الحواجز المناعية في هذه الحالة أمام حدوث الأورام القولونية وتطورها . ويلاحظ ان البيبتيدات الفعالة تزيد من معامل الابتلاع Phagocytic index للخلايا الابتلاعية ، وقد وجد ان هذا يكون مرافقا لانحسار تطور Fibrosarcoma المزروعة تحت الجلد ويمثل الورم احد الأورام المعتمدة على المناعة ، وتاثير البيبتيدات يكون بالتأثير على نمو الخلايا .

ومن مجمل الدراسات والبحوث التي قامت والتي ستجرى يمكن ان تستغل ظاهرة تداخل الجهاز المناعي مع الاحياء العلاجية والبيبتيدات في منع الحساسية والسرطانات .

البيبتيدات المضادة للتجلط Antithrombotic :

توجد عدة بيبتيدات تقوم بمنع تكون الجلطات او الخثر الدموية باليات مختلفة ويمكن ان تطلق بالتخمرات او المعاملات الانزيمية ومنها Casoplatelins المشتقة من الكازين كابا وتمثل القطعة f106-116 أي انها مكونة من 10 حوامض امينية وتقوم بمنع التخثر بواسطة منع او إيقاف وظيفة الصفائح الدموية وتجمعها ، كما انها يمكن ان تمنع ارتباط مولد الفيبرين Fibrinogen .

اما الببيتيد Casopiastrin وهو منتج ايضا من كازين كابا ويكون ببيتيد صغير (f106-110) وينتج بتأثير التربسين ويمنع ارتباط مولد الفيبرين . والقطعة من الكازين كابا (f103-111) تقوم بمنع تجمع الصفائح الدموية .

وتوجد ببيتيدات اخرى مثل تلك المشتقة من κ–caseinoglycopeptides (f112-116) والتي تطلق بتاثير الانزيم التربسين فهي ايضا تساعد في تثبيط او منع عملية تكوين الخثر ، كما ان هناك ببيتيد مشتق من اللاكتوفيرين (f39-42) الذي ينتج من تاثير انزيم الببسين يمكن ان يقوم بوظيفة مشابهة .

البيبتيدات الخافضة لضغط الدم :

يعد ارتفاع ضغط الدم من اهم العوامل في أمراض القلب والأوعية ، وتقسم مخفضات ضغط الدم الى عدة مجاميع اعتمادا على تأثيرها :

المدرات للبول .

Sympatholytic agents .

غالقات قنوات الكالسيوم .

موسعات الشرايين .

مثبطات الانزيم ACE (Angiotensin I converting enzyme) .

والبيبتيدات المخفضة تقع ضمن المجموعة الأخيرة .

وينتشر الانزيم ACE في الاوعية الدموية وجدران الطبقة المخاطية وغيرها من مناطق الجسم ويكون جزءا من المكونات الأساسية لنظام Renin – angiotensin system (RAS) الذي يعمل في تنظيم ضغط الدم وحجمه وموازنة الالكتروليتات .

و Renin هو بروتيز يحوي على حامض الاسبارتيك (Aspartic protease) وهو احد مكونات RAS ، يقوم الإنزيم بتحليل بروتين Angiotensinogen ويؤدي الى اطلاق ببيتيد مكون من 10 حوامض امينية هو Angiotensin I ويقوم الانزيم ACE وهو Peptidyl – dipeptidase الذي يفلق ببيتيد

ثنائي من النهاية الكاربوكيسيلة للـ Angiotensin I لإعطاء المركبAngiotensin II وهو ببيتد مكون من 8 حوامض امينية بعد إزالة ثمالتي His-Leu من النهاية الامينية والناتج Angiotensin II قابض للأوعية الدموية ومثبط للبروتين Bradykinin الذي هو من موسعات الأوعية وبذلك يكون توليد Angiotensin II وتثبيط Bradykinin مرافقا لارتفاع ضغط الدم بشكل مباشر .

وتاثير Bradykinin فيكون غير مباشر اذ انه يزيد من إفراز Aldosterone الذي يؤثر على احتجاز الايونات وإفراز السوائل وبالتالي رفع ضغط الدم ، ويكون Bradykinin من محفزات المناعة كما ذكر انفا .

وعليه فان أي بيبتيد يؤدي الى تثبيط فعالية ACE يعد بيبتيدا مخفضا لضغط الدم ، وهناك العديد من البيبتيدات التي عزلت ولها تأثير مخفض لضغط الدم من مصادر بروتينية مختلفة ولكن أهمها الحليب . والتخفيض في ضغط الدم بالنسبة للبيبتيدات قد لا يكون معتمد كليا على تثبيط انزيم ACE وانما قد تكون هناك آليات أخرى مساعدة . فمثلا الانزيم Chymase من الانزيمات التي تحررII Angiotensinالذي يلعب دورا مهما في رفع ضغط القلب والأوعية ، والانزيم الأخير (Chymase) يمكن ان يثبط بواسطة بيبتيد صغير Tyr-Pro ، كما ان هناك بعض البيبتيدات التي تؤثر على Bradykinin الذي يثبطه ACE .

ومثبطات ACE التي يطلق عليها Casokinins توجد في كازينات البتا والكابا في حليب الانسان وتوجد ايضا في كازينات البتا و α_{s1} البقرية . والجدول 12 يوضح بعض البيبتيدات المخفضة للضغط وأصولها والجرعة IC_{50} (وهي كمية البيبتيد اللازمة لتثبيط 50 % من فعالية ACE التي تقاس باستعمال Hippuryl-histidyl-leucine كمادة أساس) .

وإضافة الى ما مذكور في الجدول يمكن ان تصنع البيبتيدات فمثلا البيبتيد الذي له التوالي Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro كان اقوى البيبتيدات وكانت IC_{50} لها 5 مايكرومول .

جدول 12 : بعض البيبتيدات المخفضة لضغط الدم

توالي الحوامض الامينية	المصدر البروتيني	توالي البيبتيد	الجرعة IC_{50}
Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Gln	بتا - كازين	**169 - 175**	1000
Leu-Gln-Ser-Trp	بتا - كازبن	**140-143**	500
Arg-Glu-Leu-Glu-Glu-Leu	بتا - كازين	**1-6**	1000
Thr-Lys-Val-Ile-Pro	الفا - كازين α_{s2}	198 - 202	400
Ala-Met-Lys-Pro-Trp	الفا - كازين	189 -192	580

	α_{s2}		
Tyr-Lys-Val-Pro-Gln-Leu	الفا - كازين α_{s1}	104 – 109	22
Met-Lys-Pro-Trp-Ile-Gln-Pro	الفا - كازين α_{s2}	190-197	300
Leu-Leu-Tyr-Gln-Gln-Pro-Val	بتا - كازبن	191 - 197	1000
Ala-Tyr-Phe-Tyr-Pro	الفا - كازين α_{s1}	143 - 147	1000
Ala-Met-Lys-Pro-Trp-Ile-Gln-Pro -Lys	الفا - كازين α_{s2}	189-197	600

وتشتق الببيتيدات المخفضة لضغط الدم بالإضافة الى الكازينات من بروتينات اخرى مثل -β lactotensin الذي يشتق من البروتين β- LG وهو ببيتيد رباعي (f146-149) ، كما ان الببيتيد المخدر β-lactorphin المشتق من β- LG (f102-105) يكون من المثبطات القوية للـ ACE وله IC_{50} حوالي 171.8 مايكرومول ، اما الببيتيد الثنائي المشتق من الببيتد المخدر فيكون أقوى في التأثير و IC_{50} له 122 مايكرومول ، ومثل هذه الببيتيدات يكون تأثيرها عند تناولها عن طريق الفم .

ويمكن الحصول على الببيتيدات من تخمر الحليب بأحياء مختلفة مثل *Lb. delbrucekii* ssp *bulgaricus* و *cremoris* ssp *Lc. lactis* التي تحررها من الكازينات بتا . اما البكتريا *Lb. helveticus* التي تعد من اكثر بكتريا حامض اللاكتيك قابلية على تحليل البروتينات فتنتج الببيتيدات من كازينات البتا و α_{s1} . والببيتيدات يمكن ان تنتج من تأثير السلالة GG وكذلك تأثير الانزيمات الببسين والتربسين . ويمكن الحصول على الببيتيدات من بروتينات الشرش - كما ذكر اعلاه - عند تخميرها باستعمال خميرة *Kluyveromycse marxianus* var *marxianus*

آلية التأثير : تمتاز الببيتيدات المخفضة لضغط الدم بكونها قصيرة واحتوائها على البرولين عند النهاية الكاربوكسيلية ، وكذلك تحوي على حوامض امينية حلقية اخرى مثل التربتوفان او التايروسين والفنيل – النين و Imino acid proline وهذه لها ألفة عالية للارتباط بالموقع الفعال للانزيم ACE ، وعليه فان الجزء المسئول عن تثبيط الانزيم يعتمد على الببيتيد الثلاثي في الجهة الكاربوكسيلية

للببيتيد الاولي . ويكون التركيب الاساسي للببيتيدات هو احتوائها على ثمالات كارهة للماء عند الطرف الكاربوكيسلي وتصل نسب الثمالات الكارهة للماء الى 60 % من الببيتيد ، والجزء من ACE الذي يرتبط يفضل الارتباط الى الجزء الكاره للماء . وتمتاز الببيتيدات باحتوائها على اللايسين او الارجنين الموجب الشحنة في النهاية الاخرى والتي تؤدي إزالتها الى فقدان الفعالية .

أنواع الببيتيدات المخفضة لضغط الدم : تعتمد انواع الببيتيدات على الإحياء والإنزيمات المستعملة في تحضيرها . وأكثر البوادئ المستعملة هي *Lb. helveticus* لأنها ذات قوة تحليل قوية ولان الببيتيدات صغيرة وهذا يعني الحاجة الى قوة تحليل بروتينات قوية . ومن أهم الببيتيدات في هذا المجال هي الببيتيدات الثلاثية Val-Pro-Pro , Ile-Pro-Pro التي تحضر من استعمال البكتريا *Lb. helveticus* ، والببيتدات تمثل القطع كازينات بتا المرقمة (f84-86) و (f74-76) وقطعة الكابا المرقمة (f108-110) ، وجربت في الإنسان وكانت ذات نتائج جيدة ودون أعراض جانبية التي ترافق استعمال العقار Captopril الذي يؤدي الى السعال واضطراب ايض الدهون ، وIC_{50} للـ IPP هي 5 مايكرومول في حين VPP لها IC_{50} هي 9 مايكرومول . ومن المنتجات الحاوية على هذه الببيتيدات Calpis (حليب محمض Sour milk) محضر باستعمال *Lb. helveticus* وخميرة الخبز *S. cerevisiae* والمنتج الاخر Evolus المحضر من LBK-16H *Lb. helveticus* ، والمنتجات يمكن ان تعطي نتائج ايجابية عند استهلاك 150 مللتر يوميا .

ومن الببيتيدات الاخرى المهمة Tyr-Pro التي توجد عند النهاية الكاربوكسيلية للكازينات البقرية ، التي تكون بنسبة 0.98 : 1 ويوجد الببيتيد الثنائي في الكازين α_{s1} (147- f146) وفي كازين بتا (f114-115) وفي كازين كابا في القطعة (f59-58) وتكون IC_{50} هي 720 مايكرومول . ويمكن ان يصل تركيز الببيتيد عند استعمال *Lb. helveticus* الى 10 مايكروغرام / مللتر بعد مرور 10 ساعات من التخمر وبرقم هيدروجيني 4.1 عند تخمير الحليب . اما عند استعمال الشرش للتحضير فيصل التركيز الى 8 مايكروغرام / مللتر برقم هيدروجيني 4.3 ، وينتج الببيتيد من تأثير CP790 *Lb. helveticus* بتأثير الإنزيم الحال للكازينات عند النهاية الكاربوكسيلية ، ويمكن ان تنطلق في بداية التخمر كما ذكر انفا .

وتوجد الببيتيدات المخفضة للضغط في الجبن المنضج في المراحل الأولى من عمليات الإنضاج وهي تنتج من الكازينات الفوسفاتية ، واطالة مدة الإنضاج تؤدي الى اختفاء الببيتيدات نتيجة لتعرضها للتحلل .

وظائف اخرى للببيتيدات الفعالة : تعمل الببيتيدات الحيوية الفعالة في مجالات اخرى غير المذكورة ومنها

- مضادات للأكسدة ، اذ ان الببيتيدات تمتلك قابلية مضادة للأكسدة ومنها الببيتيدات المشتقة من الكازينات α_s التي لها القابلية على كسح الجذور الحرة وتقوم بمنع الأكسدة الإنزيمية وغير الإنزيمية للدهون Lipid peroxidation ، ولذلك تستعمل كمواد مضادة لأكسدة الدهون الغذائية وكذلك تستعمل في مواد التجميل والمواد الصيدلانية وربما تقوم بمنع الضرر داخل الأنظمة الحية .

- توجد بعض الببيتيدات المخفضة لكولسترول الدم (Hypocholesterolemia) ومنها الببيتيد ذو التوالي Ile-Ile-Ala_Glu-Lys الناتج من تحلل LG - β ، الذي يمنع خلايا Caco2 المزروعة من امتصاص الكولسترول خارج الأنظمة الحية وكذلك عند إعطائها للفئران في محلول عن طريق الفم .

- تساعد الببيتيدات في منع التطفير ، فعند استعمال R389 *Lb. helveticus* التي لها قابلية عالية على التحليل نتيجة لنشاط انزيمات تحليل البروتينات والببيتيدات ، ويكون الناتج ذات فعالية عالية مضادة للتطفير ، اما الحليب المخمر بالسلالة نفسها ولكن الخالية من الفعاليات التحليلية فلا تظهر مثل هذه القابلية ، وكذلك عند استعمال سلالات من *Lb. helveticus* (Prt^+) لتخمير الشرش حيث كان الناتج مضادا للتطفير المستحث بالمركب 4 –nitro – quinoline – nitro – oxide باستعمال سلالات أيمس *Sal. typhimurium* .

- هناك بعض الببيتيدات التي تساعد في وظائف خاصة مثلا الببيتيد Atriopeptin والذي يوجد في حليب الانسان بشكل طبيعي ويعمل كمدر للبول وموسع للأوعية (Vasorelxant) ويلعب دورا مهما في عمليات التحوير لتطبيع دوران الجنين عند التحول للحياة خارج الرحم

- هناك بعض الببيتيدات التي عزلت من بروتين الشرش البقري LG - β التي لها تأثيرات على العضلات الملساء .

تداخل فعالية الببيتيدات الحيوية : تتداخل الببيتيدات الفعالة في الوظائف التي تؤديها ، وقد ذكر بعض التداخلات أعلاه . اضافة الى ذلك يلاحظ ان الببيتيدات المخدرة قد تكون اكثر الببيتيدات تداخلا فمثلا الببيتيدات α , β- lactorphins تظهر تأثيرا مثبطا للانزيم ACE وبذلك تكون مخفضة لضغط الدم .

اما الببيتيدات الفوسفاتية الرابطة للكالسيوم CPPs فلها تأثيرات محفزة للمناعة وتساعد في امتصاص الاغذية . كما ان تحفيز الجهاز المناعي وبمجمل تأثيره في الدفاع المناعي تشارك فيه

بيبتيدات من اصناف اخرى مثل البيبتيدات المخفضة لضغط الدم (Casokinin) وكذلك البيبتيدات المخدرة .

والبيبتيدات الموجودة في القطعة(f60-70) من كازين بتا المذكورة اعلاه والتي وظيفتها الاساسية هي بيبتيدات مخدرة يلاحظ ان لها تأثير محفز للمناعة وكذلك مثبط للإنزيم ACE ، وكذلك تظهر القطعة (f194-199) من كازين α_{s1} وظائف متعددة مثل تثبيطها للانزيم ACE اضافة الى تحفيزها للمناعة .

الفوائد الصحية للبيبتيدات الفعالة ومستقبل تطبيقاتها :

البيبتيدات الحيوية الموجودة في الألبان والاغذية الاخرى تمثل وسائل فعالة للتأثير على صحة المستهلك ، وقد أصبح من المقبول ان مواد الايض الناتجة أثناء التخمر يمكن ان تفيد أكثر من الخلايا ومكوناتها مثل الجدران الخلوية ومحتويات السايتوبلازم ، وتعد البيبتيدات أكثر مواد الايض الناتجة أهمية .

ولا تزال تحتاج الى دراسة الآليات التي تعمل بها بشكل دقيق ومفصل ولكن مع هذا فان المنتجات الحاوية عليها تسوق تجاريا . والشركات في سباق لاستغلالها في التأثير على صحة الإنسان وتحسين تغذيته من خلال إعداد الأغذية الفعالة Functional foods و Nutraceuticals ، وتحضير مواد التجميل الحاوية عليها وبعض الأدوية التي لها تأثيرات صيدلانية مهمة وكذلك استعمالها في مجال الحفظ الحيوي للأغذية .

ويحتاج استعمال البيبتيدات الحيوية الفعالة الى معرفة عدة جوانب منها :

- تداخل البيبتيدات مع بعضها خاصة وان بعض البيبتيدات يمكن ان تقوم باكثر من دور فسلجي تداخل البيبتيدات مع مكونات النظام الذي ستدخل فيه مثل مكونات الغذاء وغيرها .
- آلية تأثيرها المتخصصة ومعرفة التركيز الأمثل والجرع الملائمة وتكرارها . معرفة جاهزيتها الحيوية .
- معرفة الطرق المثلى لإنتاجها والأحياء الأكثر إنتاجا وكذلك طرق الاستخلاص الملائمة .

فالدراسات التي اجريت كانت معتمدة على استعمال بيبتيد مفرد وهذا بطبيعة الحال سيؤثر بشكل غير مشابه عند وجوده مع مكونات اخرى كما يظهر من استعمال الحليب المخمر كاملا . كما ان تحديد الجرع يكون مهما ، فزيادة الجرع بعض الأحيان تؤدي الى نتائج عكس المرجوة منها في المضيف وهذه تختلف بالنسبة للبيبتيد المفرد عما هو الحال في خليط من البيبتيدات او المكونات الاخرى ، فمثلا الإعطاء المستمر للمواد المنظمة للمناعة يمكن ان يعطي إشارات سالبة للجهاز المناعي تؤدي الى زيادة الاستجابة الالتهابية .

ومن جهة ثانية تكون الدراسات لازمة لإيضاح التدخلات فمثلا المورفينات الكازينية يمكن ان تؤثر على حركيات وداينميكية الفعاليات الحيوية في الأحياء ، وتقلل هذه الببيتيدات حركة الامعاء ، ولكن هذا قد يؤدي الى زيادة تأثير المواد الأخرى مثل البكتريا والخلايا المستهدفة ، كما ان التآزر مع المواد غير الببيتيدية مثل الدهون والدهون السكرية والسكريات قليلة التعدد ربما كانت ضرورية للتعبير عن فعالياتها

والتفكير في زيادة الببيتيدات الحيوية باستعمال أحياء ذات فعالية تحليلية عالية او هندستها تمثل إحدى الوسائل لاغناء الاغذية ولكن هذه يجب ان تؤخذ مع الحذر .

ولذلك فان تدعيم الأغذية الصحية او الفعالة او أي من التسميات والمنتجات الأخرى يجب ان تخضع الى تدقيق علمي كبير لتحديد فيما اذا كانت الفائدة المرجوة سيتم الحصول عليها من الإضافات ام لا . لذلك تحتاج عمليات الإضافة الى :

- دراسة تداخل الببيتيدات مع مستلماتها داخل الجسم الحي .
- تأثيرها على الفلورا الطبيعية للجسم والتي تختلف بين الأشخاص والجرع المختلفة
- ملاحظة وجود الببيتيدات المخدرة والاخرى المضادة لها وتحديد نسبها او تفضيل وجود نوع واحد منها اعتمادا على الغرض من تحضير الوصفة الغذائية او الصيدلانية .

وبدراسة الجوانب المختلفة فان الببيتيدات الحيوية يمكن ان تكون من الروافد الواعدة في معالجة أمراض القلب والأوعية وأنواع السرطانات ، وكذلك معالجة هشاشة العظام في المجاميع المعرضة لها ومعالجة السمنة ، وربما يكون ذلك عن طريق وصفات صيدلانية او تصميم اغذية خاصة .

استعمالات بكتريا حامض اللاكتيك المهندسة وراثيا

- استعملت البكتريا في نقل ألجين المسؤول عن تخليق الانزيم الحال للدهون Lipase (*lip* gene) من البكتريا *Staph. hyicus* للمساعدة في هضم الدهون والتخلص من حالة الإسهال ألدهني Steatorrhea وكذلك في معالجة بعض حالات امراض البطن Celiac disease ومن البكتريا المرشحة او المستعملة هي *Lc. lactis* التي تؤدي الى تحسين حالة الحيوانات التي عندها قصور في البنكرياس . كما أمكن باستعمال البكتريا نقل ألجين المسئول عن تحلل الدهون من البكتريا *Staph. carnosus* على سطحها .
- استعملت بعض الأنواع في إنتاج بعض السايتوكينات بعد إدخال الجينات المسؤولة عن إنتاجها مثل بكتريا *Lc. lactis* التي تنتج IL-12 الذي حسن كثيرا حالة المضايف المستلمة لها وذلك ان الانترلوكين المنتج يحفز الخلايا التائية المساعدة Th1 على إنتاج السايتوكينات الخاصة بالمستضد .

كما أمكن هندسة سلالات من البكتريا لإنتاج IL-10,IL-6,IL-2 وكلها مفرزة الى الوسط المحيط والأخير يساعد في علاج الفئران المصابة بالتهاب القولون ويقلل الإسهال بنسبة 50 % .

- استعملت في التعبير عن بعض التراكيب البكتيرية من البكتريا الممرضة او المنتجة للسموم كما في التعبير عن القطعة المسؤولة عن سم الكلوستريديا المسبب للكزاز Tetanus . وكذلك البروتين L7/L12 الرايبوزومي من *Brucella abortus* المثير القوي للمناعة وكذلك في التعبير عن السكريات المكوثرة العلبية Type 3 من Pneumococci .
- استعملت *Lc. lactic* للتعبير وإنتاج الوحدة الفرعية subunit B من إنزيم يوريز *Helicobacter pylori* واستعماله كلقاح ضد الإصابة بالبكتريا التي يعد إنزيم اليوريز أساس لبقائها في المعدة .
- استعملت بعض سلالات او أنواع بكتريا حامض اللاكتيك في حث الأجسام المضادة للبروتين Bovine β - lactoglobulin (BGL) والذي يعد من المحسسات القوية في حليب الأبقار (باستعمال الممهد *nis* A لانه من الممهدات المستحثة) وأدخلت الخلايا المهندسة عن طريق الفم والأنف Intranasally فكانت النتيجة تحفيز جسم المضيف لإنتاج IgA الخاصة بـ BGL .

استعملت بكتريا *Lc. lactic* في التعبير عن عدد من البروتينات الفيروسية ومنها المستضد E7 من HPV type16 المشتقة من Human papillo - oncoprotein الذي يفرز الى الوسط المحيط ، وكذلك البروتين nsp4(Non-structural protein) من الفيروسات العجلية البقرية (Bovine rotavirus .) الذي يبقى في السايتوبلازم ، وكذلك Bovine coronovirus BCV () الذي يصيب الابقار ويفرز الى الوسط المحيط .

في عالم الدواجن استعملت البكتريا *Lc. lactis* لحمل ونقل بعض مستضدات القفيصة الفيروسية Viral capside antigen للفيروس الذي يصيب الدواجن Infectious bursal disease virus (IBDV) والمستضدات التي استعملت هي vp3 ، vp2 ونميت البكتريا التي كانت مصممة لإنتاج المستضدات المرتبطة الى جدار الخلية والإفراز الى الوسط الغذائي (كما سيأتي ذكرها لاحقا) ، ثم أعطيت الى الدواجن مما أدى الى ظهور IgG ضد المستضدات وحماية الحيوان

- هندسة *Lc. lactis* لتحوي على مستضدات الغلاف لفيروس الايدز . HIV env وأعطيت الى الفئران مما ادى الى رفع الاجسام المضادة الخاصة HIV- specific serum IgG الى 300 ضعف عن مجموعة السيطرة ، كما ارتفع IgA الى 100 ضعف في الغائط ، وأدى استعمال هذه السلالة الى زيادة المناعة الخلوية كما تبين من دراسة الطحال والعقد اللمفاوية إذ وجد زيادة في كمية IFN-γ المفرز اضافة الى زيادة عدد الخلايا المتخصصة المفرزة .

- استخدمت البكتريا *Lc. lactis* أيضا للتعبير عن الإنزيمات المحللة للفيروسات Bacteria phage- lytic enzymes ضد البكتريا الخطرة *L. monocytogenes*.
- إضافة الى إنتاج الكثير من البروتينات الغريبة على الخلايا وبكميات كبيرة سواء من الخلايا حقيقية النواة او بدائية النواة او الفيروسات وباستعمال تشكيلات خاصة لعمليات الهندسة الوراثية مثل استعمال الممهدات المستحثة Inducible promoters او الممهدات الاصيلة Constitutive promoters وكذلك التحكم بعملية التعبير عن الجينات في بكتريا حامض اللاكتيك التي تخضع لظاهرة تحسس الزحام Quorum sensing .

نقل المستضدات :

تبين من التطبيقات اعلاه ان اكثر التركيز هو حول ايصال جزء (مستضد) من الكائن المرضي الى الجهاز المناعي للانسان دون الكائن المرضي كاملا لتحاشي الاصابة ، ويمكن ذلك بادخال الجين المسؤل عن تخليق المستضد .

وكانت ولا تزال هناك ستراتيجيات مختلفة لنقل المستضدات الى الطبقة المخاطية ومنها استعمال البكتريا المرضية كناقل للقاح وهي اكثر الطرق المدروسة والافضل ان تكون الاحياء مضعفة لتكون وسيلة فاعلة في ايصال المستضد لاثارة الاستجابة المناعية المتخصصة ضد الكائن الممرض للحماية ضد المرض ودون توليد المرض . وفي هذا المجال هناك العديد من الاحياء المطفرة لتكون ضعيفة الامراضية استعملت ومنها طفرات من *L. monocytogenes* ، *Sal. typhimurium* ، *Sh. flexneri* ، *Mycobacterium bovis* ، *Y. enterocolitica* ، *V. cholerae* .

وبالرغم من ان هذه الاحياء قد هندست لتقليل أمراضيتها ألا انها تبقى محتفظة بشيء من قابليتها على الغزو Invasion وشيء من الضراوة Virulence لذلك كان استعمالها في الأطفال والأشخاص منقوصي المناعة محدودا .

تطوير أنظمة لنقل المستضدات

لتطوير أنظمة حية لنقل المستضدات واستعمالها كلقاحات هناك بعض الامور الضرورية :

1- توفر بكتريا او كائن ناقل .

2- تقديم المستضدات بشكل ملائم للجهاز المناعي .

فاللقاحات التي تستهدف الطبقة المخاطية يجب ان تشجع التلامس الكفوء بين المستضد والجهاز المناعي لتحفيز الاستجابة المناعية بذراعيها الخلطي والخلوي ، وان تكون ثابتة وتضفي حماية طويلة الأمد بعد إعطاء جرعة واحدة او أكثر . وهناك توجهان

الأول : استعمال الخلايا نفسها كمساعدات والتي تمثل مواد تستطيع زيادة الاستجابة المناعية ويمكن ان تنشط الجهاز المناعي بطرق مختلفة ، وتؤدي الى زيادة وقت الاستجابة المناعية وبقائها لمدة طويلة ، كما انها تستطيع تحوير تخصص الاستجابة المناعية مثل زيادة المناعة الخلطية او الخلوية . وفي الوقت الحاضر تستعمل سموم بكتريا *V. cholerae* والسم المعوي للـ *E. coli* لثابت للحرارة لهذا الغرض ، اضافة الى استعمال بعض السايتوكينات كمساعدات لحث الاستجابات المناعية في الطبقة المخاطية الموضعية وكذلك في حث المناعة الجهازية . ومن ضمن بكتريا حامض اللاكتيك المفيدة في هذا المجال بشكل كبير هي العصيات اللبنية .

الثاني : إدخال المستضدات المعنية ضمن خلايا بكترية حية مثل بكتريا حامض اللاكتيك بعد هندستها بالشكل الملائم .

والمشاكل إمام تطوير نظام النقل هذا :

1- إنتاجه في المكان الصحيح في الخلية .

2- السيطرة على مستوى التعبير عن جينات المستضد المدخلة .

وذلك لغرض الحصول على أفضل واكبر استجابة مناعية عند الاستعمال . ومن أفضل أفراد بكتريا حامض اللاكتيك المرشحة لهذه الإعراض هي بكتريا *Lc. lactis*

المكورات اللبنية *Lc. lactis* المهندسة وراثيا

البكتريا لا تعود الى فلورا الامعاء الطبيعية للإنسان لذلك فهي لا تستعمر القناة الهضمية او الفم وهي غير مرضية وامينة الاستعمال في الأغذية (Food grade) ، وهذه المواصفات تؤهلها لأن تكون وسيلة لنقل اللقاحات الحية أي تكون ملائمة للتمنيع المعوي ، كما ان عدم إقامتها في الامعاء يؤدي الى عدم حصول حالة التحمل في الجهاز المناعي .

والبكتريا تكون ملائمة لإنتاج البروتينات الغريبة فيها وبعض الأحيان إفرازها وذلك لأنها :

1- تفرز القليل من البروتينات وأهمها usp 45 (unknown secreted protein) وزنه الجزيئي 45 كيلو دالتون والبروتين يفرز بكميات كبيرة

2- اغلب البروتينات المفرزة من قبل البكتريا تتعرض للتحلل البروتيني بالبروتيزات بعد افرازها ، وسلالات *Lc. lactic* المستعملة في هذا المجال لا تنتج بروتيزات خارجية أي تكون قد حورت للتخلص من هذه الفعالية .

ولاجل نجاح البكتريا في اداء مهمتها في ايصال المستضد الى المكان الصحيح لا بد ان تزود بوسائل تساعدها على ذلك ومنها :

الممهدات الملائمة Promoters : هناك حوالي 38 ممهد اصيل مسئول عن تخليق البروتينات في البكتريا ، ولكن استمرار تخليق البروتينات يؤدي الى تجمعها في الخلية ويمكن ان تتحلل في السايتوبلازم . لذلك لم يستعمل اكثرها وانما استعملت ممهدات مستحثة لانه في مثل هذه الحالة يمكن السيطرة على تخليق البروتينات باستعمال :

1- المواد الحاثة .

2- المواد الكابحة Repressors .

3- السيطرة باستعمال الظروف البيئية مثل التغير بالرقم الهيدروجيني او الحرارة او تركيز الايونات وقد استعملت ممهدات من أحياء أخرى لهندسة البكتريا منها

- ممهدات العاثي T7 من *E. coli* ولكن هذا غير مفيد لانه يشكل خطر على الخلايا .
- ممهدات من اوبرون اللاكتوز *lac* operon واستعمال الممهد يتعثر بإنتاج المواد الوسطية .
- الأنظمة الأخرى اعتمدت على عاثيات البكتريا نفسها ولكن بعد دمجها مع مكونات أخرى كما في النظام المسمى Explosive gene expression system ، وفيه يتم ربط ممهد لعاثي يصيب البكتريا يقوم بتضخيم DNA إمام الجينات المراد التعبير عنها والذي يؤدي الى زيادة البروتينات المطلوبة الى حوالي 30 ضعف ولكن وجود ممهد العاثي يؤدي في النهاية الى تحلل الخلايا بشكل غير مسيطر عليه وهذه صفة غير مرغوبة .
- استعمل الممهد P170 وهو ممهد معزول من المكورات اللبنية وهو ممهد قوي جدا يعمل عند رقم هيدروجيني واطئ فقط ، وعند دخول الخلايا طور الاستقرار من أطوار النمو ، ويكون نشطا بدرجات الحرارة العالية ويمكن ان ينظم أيضا بتغير تراكيز ايونات الكلور Cl^- وايونات الزنك Zn^{++} .
- استعمل ايضا ممهد ألجين *nis* A (ولعله الأكثر ملائمة) والجين يعمل في اوبرون النايسين ومسئول عن تكوين الجزيئة الأولية للنايسين قبل نضجه ، ويحتوي الممهد على توالي بسيط يعمل بكفاءة على عملية البدء اعتمادا على تركيز النايسين الخارجي ، وهذا الممهد يمكن ان يسيطر على التعبير عن الجينات بمدى يصل 1000 مرة .

النواقل : المتطلب الأخر لإجراء عمليات الهندسة الوراثية ونقل الجينات هو توفر النواقل الملائمة . وأفضل البلازميدات الناقلة المستعملة هو pI501 والذي يعود للبكتريا نفسها ويحتوي البلازميد على *tra* genes المسئولة عن التشفير لبروتين الانتقال ويحتوي ايضا على *mob* genes المسئول

عن تخليق بروتينات تحريك البلازميدات والجينات التي تحملها . وأضيف الى البلازميدات واسمه مقاومة الكلورومفينكول Cm^r وأعطي الاسم pI205 .

البلازميد الأخر المهم والمستعمل هو pRsol ويحمل البلازميد الجين *ltr* B المسئول عن ثلم DNA أي ينتج إنزيم Relasase ليسهل انتقال DNA وربما يشفر لبروتينات أخرى لتكوين معقد الارتخاء Relaxosome .

ويمكن اختيار البلازميدات وفق الحاجة فبعض النواحي تحتاج الى بلازميدات تتضاعف بشكل كبير وتكون نسخ كثيرة High copy No. plasmids وأخرى تحتاج الى بلازميدات تكون موازية لتضاعف جيوب Low copy No . plasmids .

وتستعمل في تحوير البكتريا الأخرى (الاقل أهمية) بلازميدات اخرى ، إضافة الى استعمال Tn 5276 وهو من الجينات القافزة الذي يمكن ان يحمل الجينات المسؤلة عن إنتاج النايسين وتخمير والسكروز Nisin – sucrose conjugative transposon والتي هي صفات متلازمة .

الواسمات Markers : دأبت عمليات الهندسة الوراثية التقليدية على استعمال صفة المقاومة للمضادات الحيوية كواسمات مهمة وهذه غير مرغوب فيها في إحياء يراد ان تستعمل في الأغذية او في القناة الهضمية مباشرة .

ولذلك فمن الأفضل استعمال واسمات بديلة وقد أمكن في هذا المجال استعمال طفرات العوز الغذائي Auxotroph مثل الحاجة للثريونين او بعض البريميدينات Pyrimidines ووجد أنها ثابتة ولا تؤثر على معدلات نمو البكتريا *Lc. lactis* ولا على تحميض الحليب ولذلك فان مثل هذه المواصفات تبقى ضمن حالة الأمان Food grade status .

أنظمة توجيه البروتينات Protein targeting systems

ان الفائدة المرجوة من هندسة الاحياء تكتمل عندما يكون هناك توجيها صحيحا للبروتينات المنتجة بعد إدخال المعلومات الوراثية الخاصة بها .افاستعمال وسائل او مكائن لتصدير وتوجيه البروتينات تعد أساسية في الاحياء المهندسة في تطبيقات التقنية الحيوية سواء كانت في العمليات التي تتم خارج الأنظمة الحية او داخلها في الإنسان والحيوان .

فإفراز البروتينات الى الوسط المحيط وارتباطها الى الخلايا على الجدار الخلوي تعد من الوظائف الرئيسة لبكتريا حامض اللاكتيك في تداخلها مع البيئة المحيطة . وفي مجال هندسة بكتريا حامض اللاكتيك وعلى وجه الخصوص بكتريا *Lc. lactis* التي تعد نموذجا لهذه المجموعة تم أيجاد أنظمة لتوجيه البروتينات الغريبة المنتجة فيها ، فالبعض يمكن ان يبقى في السايتوبلازم ، وأخرى

يمكن ان تصدر من داخل الخلية الى الوسط المحيط او تبقى مرتبطة بالسطوح الخارجية للخلايا . وتعد هذه من الضروريات عند استعمال البكتريا كناقل حي للقاحات في القناة الهضمية على وجه الخصوص . فإفراز المستضدات الى البيئة الخارجية و بقائها مرتبطة بالسطوح الخارجية للخلايا يساعد في ملامسة هذه المستضدات للجهاز المناعي وبشكل ملائم مما يؤدي الى استحثاث وتحفيز الجهاز المناعي . وعملية توجيه البروتينات تعتمد على وجود الأنظمة الخاصة بها ومنها :

1- أنظمة او مكائن إفراز البروتينات Sec-dependant machinery وهي أنظمة مسئولة عن نقل البروتينات عبر الأغشية . وهذه الأنظمة عامة أي توجد في البكتريا التي تقوم بعملية إفراز البروتينات ، وتتكون من عدة بروتينات منها ببتيد الإشارة وكذلك عدد من البروتينات الوصفية الخاصة Sec-specific chaperones التي تقوم بمنع انطواء البروتين الى ان ينقل البروتين الكامل او الناضج المرتبط مع ببتيد الإشارة N-terminal signal peptide (SP) عبر الأغشية . وبعد عملية عبور الغشاء ينفلق ببتيد الإشارة بإنزيم خاص Signal peptidase مؤديا الى إطلاق البروتين الى الوسط المحيط . ويستعمل ممهد *usp* 45 بكثرة لهذا الغرض .

وبيبتيد الإشارة يظهر تغايرا نوعا ما أي يكون غير ثابت التركيب ولكن في العموم يتكون من ثلاث مناطق ،الطرف الاميني مشحون بشحنة موجبة والمنطقة الوسطية كارهة للماء ومتعادلة والمنطقة الثالثة او النهاية الكاربوكسيلية C-terminal تكون مشحونة بشحنة سالبة تحوي على موقع انفلاق ببتيد الإشارة . ووجود هذه المناطق المتغيرة الشحنة تؤثر على افراز البروتين المنتج حتى عند اخذ الاحتياطات اللازمة مثل استعمال ممهد *usp* 45 وذلك لتأثير الشحنات الكهربائية وتوازنها بين ببتيد الإشارة والبروتين المراد تصديره او إفرازه ، فعملية النقل الكفوء تتم عندما تكون النهاية الامينية للبروتين المراد نقله اقل من ناحية وجود الشحنات الموجبة من تلك الموجودة في النهاية الامينية لببتيد الإشارة ، أي ان الشحنات الموجبة على البروتين المراد نقله تؤثر بشكل كبير على عملية الإفراز ، وقد أمكن معالجة هذا باستعمال ببتيد مصنع من تسع حوامض امينية ذات شحنات سالبة بعد موقع انفلاق ببتيد الإشارة مما أدى الى زيادة إفراز البروتينات .

2- الوسيلة الثانية في توجيه البروتينات الغريبة المخلقة هو ربطها الى الجدران وذلك لإغراض معينة . وتتم هذه باستعمال نظام او ماكنة Sortase machinery وهذه وصفت لأول مرة في البكتريا *Staph. aureus* ، اذ توجد بعض البروتينات التي ترسي او تربط البروتينات بأواصر تساهمية مع الببتيدوكلايكان . ومنها البروتين المرسي CAW protein A الذي يخلق في البداية على شكل بروتين أولي Preproprotein يحوي على ببتيد الإشارة عند النهاية الامينية ، والطرف الثاني الذي يربط الى الجدار الخلوي يقع عند النهاية الكاربوكسيلية المشحونة (CCWA) C-terminal cell wall anchor . ويتكون البروتين من حوالي 30 حامض أميني يحوي على

منطقة ثابتة مكونة من توالي حوامض امينية معينة (LPX TG) تستعرض الجدار الخلوي وعند نقل البروتين عبر الغشاء فان الجزء الموجود في الغشاء يساعد نقل البروتين بسلسلة من التفاعلات وهي :

- فصل الآصرة الاميدية بين الكلايسين والثريونين في LPX TG
- تكوين ارتباط تساهمي للنهاية الحاوية على الثريونين مع الحامض الاميني للبروتين عبر جسر البيبتيدوكلايكان اي تكون ارتباط Transpeptidation بين LPX TG والببتيدوكلايكان

ويمكن زيادة كفاءة النظام بتغيير الحوامض الامينية وإضفاء الشحنة المطلوبة على ببتيد الإشارة مثل تغير نسب الكلايسين والثريونين التي يمكن ان تؤثر على طوي البروتينات المصدرة بشكل ملائم لمنع تحليلها بالبروتيزات التي تشكل إحدى العقبات .

ويمكن استعمال نظام إرساء أخر لغرض ربط البروتينات الغريبة المنقولة الى الخلايا على السطح وهو البروتين M6 من البكتريا *Streptococcus pyogenes* والنظامان اثبتا جدارة عند استعمالهما في بكتريا حامض اللاكتيك .

وفي عمليات توجيه البروتينات يستعمل عادة دالة معينة او جين يشير الى عمليات الارتباط او الانفكاك من الخلايا يسمى بجين الاعلان Reporter gene ويستعمل لهذا الغرض إنزيم تحلل الحوامض النووية Nuclease من البكتريا *Staph . aureus* وذلك لعدة أسباب :

- من السهولة الكشف عنه في الأوساط الغذائية او التقديرات المناعية مثل استعمال طريقة Western blots
- ملائم للتحليلات الكيموحيوية لأنه ثابت للحرارة حتى بدرجة الغليان .
- يمكن استعادته بعد حصول المسخ (Redenaturation) بواسطة كبريتات الصوديوم SDS او المذيبات العضوية .
- الانزيم غير فعال داخل السايتوبلازم .

وأمكن تصميم النواقل الملائمة لذلك وهو وضع قطعة DNA المسئولة عن *nuc* gene من *Staph . aureus* في البلازميد pVE3509 لإنتاج البلازميد المستعمل pGK :: nuc1.6 الذي اثبت كفاءة في نقل المعلومات الوراثية الى *Lc. lactis* التي أنتجت الانزيم بوحدتيه Nuc A (168حامض أميني) والوحدة Nuc B (149حامض أميني) وكانت الوحدتان فعالة .

ويرتبط الانزيم عند توجيه الى الجدران الخلوية بارتباطات كهربائية مستقرة Electrostaticاذ يمكن ازالته بتغيير تركيز الأملاح .

ومن هذا يتضح ان نجاح توجيه البروتينات بعد إدخال المعلومات الوراثية المسئولة عنها يرتبط بوجود أنظمة لإفرازها او ربطها الى انظمة إرساء على سطوح الخلايا . ولكن هذا النجاح قد

لا يكتمل وذلك لان معظم الخلايا ومنها *Lc. lactis* تحتوي على البروتيزات مثل Htr A الموجود على سطح الخلية ولكن هذا البروتين يمكن تقليل فعاليته باستعمال الأملاح ، كما يمكن تقليل فعالية او إلغاءها باستعمال طفرات تخلو منه ، وتحتاج عملية تصدير البروتينات ايضا الى تثبيط نظيره clpP داخل الخلايا . إما الإمكانية الأخرى التي تزيد من الكفاءة هو زيادة التعبير عن الوصيفات التي تشارك في عمليات الثباتية والتصدير .

تطبيقات الهندسة الوراثية في *Lc. lactis*

ذكرت بعض التطبيقات لاستعمال بكتريا حامض اللاكتيك في الهندسة الوراثية وإمكانية استعمالها كمضايف لإنتاج البروتينات الغريبة سواء كانت البروتينات لخلايا حقيقية النواة او بدائية النواة او الفيروسات . وكانت أكثرها حول استعمال نقل جينات المسئولة عن سم الكزاز Tetanus toxin fragment C (TTFC) وهي من الموديلات المستضدية المولدة للمناعة وقد ربط ألجين المسئول عنها مع جين *usp* 45 الذي يميز بكفاءة من قبل ماكنة الإفراز وبالتالي يفرز بكفاءة خارج الخلايا . وعند إعطاء الخلايا عن طريق الفم للفئران وجد ان هناك زيادة في IgA , IgG المضادة للـ TTFC وأصبحت الفئران مقاومة لتأثير السم القاتل .

وقد كانت هناك تجربة ناجحة في هندسة *Lc. lactis* وذلك بإدخال المعلومات الوراثية للمستضد السم TTFC والمعلومات الورثة للـ IL-2 , IL-10 وأعطيت عن طريق الاستنشاق بمعدل 10^9 وحدة تكوين المستعمرات للفئران وقد أدى ذلك الى تضخيم الاستجابة المناعية ضد السم Anti-TTFC بنسبة 10-15 مرة بقدر الاستجابة عند أعطاء خلايا تحمل معلومات TTFC لوحدها .

وألان تتوفر العديد من الأنظمة لبكتريا *Lc. lactis* تختلف من حيث القوة في استثارة المناعة والتنظيم ، فالبعض منها قوية وبتنظيم صارم ولذلك فهي تمثل وسائل فاعلة في السيطرة على انتاج البروتينات الغريبة من حيث الكمية ووقت التعبير والظروف .

انتاج مستضدات *Brucella*

البكتريا *Br. abortus* تمثل احد المشكلات العالمية . وتلقح الأبقار ضدها باستعمال سلالات مضعفة ومهندسة بحيث تحوي على بعض المستضدات المشتقة من سلالات ضارية وهذه لا ينصح بتلقيح الأبقار الحوامل لأنها تسبب الإجهاض ، كما انه لا توجد لقاحات للإنسان .

والمشكلة مع هذه البكتريا هو تطفلها داخل الخلايا وهذا يعني أنها تحتاج الى استثارة المناعة الخلوية ضدها . ومن المستضدات البكترية التي تؤدي الى استثارة المناعة الخلوية البروتين الرايبوزومي L7/L12 . والوسيلة الواعدة في هذا المجال هي استعمال بكتريا حامض اللاكتيك لإدخال هذا المستضد للتغلب على استعمال *Br. abortus* المضعفة والمهندسة لتحمل L7/L12 .

والمستضد L7/L12 هو بروتين سايتوبلازمي ، وقد ذكر أنفا ان نجاح استعمال اللقاحات الحية يعتمد على وجود المستضد وتعريضه بأفضل وضع للجهاز المناعي ، لذلك استغلت البكتريا *Lc. lactis* للتعبير عن البروتين وإفرازه الى الوسط المحيط باستعمال ببتد الإشارة للبروتين usp 45 الانف الذكر واستعمال *nuc* كجين إعلان او دال .

وقد حضرت سلالات للتعبير عن البروتين ولكن بشكل مربوط الى الجدار باستعمال M6 وهذه الخلايا ملائمة للتلقيح الفموي . وذلك لان الارتباط الى الجدار الخلوي يقلل من تأثير البروتيزات او الظروف غير الملائمة مثل حموضة المعدة .

ان إنتاج البروتين في سايتوبلازم الخلية له بعض الفوائد فهو يحمى المستضد من الهضم في الجزء الأعلى من القناة الهضمية وعندما تعبر الاحياء الى الامعاء يمكن ان تتحلل الخلايا وينطلق المستضد ، ومن جهة ثانية يلاحظ ان بقاء المستضد داخل الخلية يمكن ان يتعرض للهضم بواسطة البروتيزات الداخلية مثل البروتيز clpP ولكن هذا يمكن معالجته باستعمال $clpP^-$ أي طفرات تخلو من البروتيز .

هندسة جنس العصيات اللبنية للإغراض المناعية

علاقة العصيات اللبنية بالمناعة معروفة فهي تعمل كمساعدات ، Adjuvants ولكن التعامل معها من النواحي الوراثية يكون صعبا مما جعل *Lc. lactis* الاختيار الأول في الدراسة والتطوير . ولكن مع هذا بدأت عمليات هندسة العصيات اللبنية واستعمالها كوسائل لنقل المستضدات . وقد أمكن استعمالها كنواقل للبروتينات الغربية المفرزة او المرتبطة الجداران ، إذ أمكن إرساء البروتين Nuc على جدران كل من البكتريات *Lb. reuteri , Lb. plantarum , Lb. sakei , Lb. casei , Lb. johnsonii* وعلى الغرار نفسه استعملت البكتريا *Lb. plantarum* الحاوية على TTFC في الأنف للفئران وأدت الى حث استجابة مناعية لديها وحمايتها .

ولعل التطلعات المستقبلية تكون اكبر من الموجود حاليا ويمكن زيادة كفاءة أداء الاحياء في هذا المجال عند استعمال خليط من الاحياء المهندسة وراثيا او استعمال خلايا مهندسة لأكثر من بروتين مثل التعبير عن المستضدات وإنتاج السايتوكينات إضافة الى كون الخلايا لها صفة المساعد .

المحور الثالث : تغيير نمط الفعاليات الحيوية في القناة الهضمية نتيجة لتغيير الفلورا :

بعد ما ذكر عن قابليات الاحياء العلاجية من حيث إفرازها للمواد المثبطة للأحياء الأخرى والتنافس وتأثيرها على الجهاز المناعي الذي يؤدي الى التأثير على جوانب كثيرة . فان المحور الثالث يعمد الى مناقشة قابلية الاحياء العلاجية على تغيير نمط الفعاليات الحيوية في القناة الهضمية

الذي يعد اهم المجالات التي تحصل فيها المواجهات مع الاحياء الممرضة والمواد السامة وغيرها من المؤشرات ، إما القناة التناسلية والتي تعد ايضا مجالا مفتوحا فسيفرد لها فصل خاص بها .

تقوم الفلورا البكترية بالعديد من التأثيرات الايضية نتيجة إنتاجها لعدد كبير وبكميات متفاوتة من الإنزيمات والتي تستعملها في فعالياتها الايضية والتي يمكن ان تستعمل من قبل المضيف . فهي بذلك تعوض عن نقص بعض الإنزيمات مثل إنزيم اللاكتيز ولذا تستعمل في علاج عدم تحمل اللاكتوز.

وتساعد البكتريا في تخفيض الكولسترول بآليات مختلفة كما سيأتي ذكره في الفصول القادمة . ولعل من أهم فعالياتها انها تزود الجسم بعدد من الفيتامينات ولذلك كان الجسم في غنى عن بعضها وعند استعمال المضادات الحيوية وجب إعطاء الفيتامينات للتعويض . وفي هذه النقطة تشترك العديد من فلورا الامعاء في إنتاج الفيتامينات وقد سجل للبكتريا المنشطرة المعزولة من الإنسان دورا بارزا في ذلك ، والجدول (13) يوضح ذلك .

جدول 13 : الفيتامينات التي تنتجها انواع البكتريا المنشطرة

B. adolescentis	*B. bifidum*	*B. longum*	*B. infantis*	*B .breve*	**الفيتامين**
+	+++	+	+++	+	Thiamin(B1)
+	++	+++	+	+	Riboflavin(B2)
++	+	+++	++	++	Pyridoxine(B6)
+	++	+	+++	+	Folic acid(B9)
+	+	+++	++	+	Cobalamin(B12)
+	++	+++	++	++	Ascorbic acid(C)
+	+++	+	+++	+++	Nicotinic acid(pp)
++	++	++	+++	++	Biotin(H)

مواد الأساس للأحياء العلاجية

مما لاشك فيه ان الاحياء العلاجية تزداد فعاليتها والفوائد المرجوة منها عند توفر الظروف الملائمة ومنها توفر مواد الأساس التي تعمل عليها أي إعطاء الاحياء العلاجية مع مساعدات العلاج الحيوي وان كانت الأخيرة لها تأثيراتها المفيدة حتى عند إعطاءها لوحدها .

المواد المساعدة للعلاج الحيوي هي مواد غير قابلة للهضم من قبل الإنسان ولكنها تستهلك من قبل الاحياء العلاجية مثل العصيات اللبنية والبكتريا المنشطرة مؤدية الى زيادة إعدادها في الامعاء . وهناك بعض المواصفات في المواد التي تحتاجها الاحياء العلاجية ومنها :

- تحتاج الاحياء العلاجية الى مواد بطيئة الامتصاص او لا تمتص في الامعاء أي تكون انتقائية للاحياء المفيدة المتعايشة في الامعاء وخاصة القولون ويجب ان تساعد في تغيير الفلورا تجاه الجوانب الصحية .
- الاحياء العلاجية لا تستعمل السكريات غير المختزلة .
- تستطيع البكتريا المنشطرة استهلاك السكريات الثنائية والثلاثية الحاوية على الكلاكتوز دون الحاجة الى عمليات تطبع ويمكن ان تستعمل الانيولين Inuline ولكن بعد طور تطبع .
- يمكن لكل من العصيات اللبنية والبكتريا المنشطرة استعمال السكريات قليلة Oligosaccharides

والجمع بين المواد يؤدي الى نتائج أفضل ويشجع نمو كل من العصيات اللبنية والبكتريا المنشطرة والذي ينعكس تأثيره على الرقم الهيدروجيني للغائط . وتزيد مساعدات العلاج من جاهزية الكالسيوم وتقلل من تطور الافات السابقة للتسرطن Precancerous lesions ، اضافة الى تحويرها ايض الدهون في الجسم . ويسوق العديد منها على شكل مستحضرات دوائية حاوية عليها خاصة الانيولين .

واكثر مساعدات العلاج الحيوي التي انصبت عليها الدراسات هي الكاربوهيدرات ومنها :

السكريات قليلة التعدد :

1- الرافينوز Raffinose الموجود في العديد من النباتات .

2- سكريات فول الصويا مثل Stachyose والرافينوز والانيولين والنشأ المقاوم .

واهم مصادر النشأ المقاوم هي خرشوف القدس Jerusalem artichoke . ويمكن ان يحضر من السكريات بطرق إنزيمية وهي الأسهل في عزلها وتنقيتها من المصادر الطبيعية ويصل تعداد السكريات الى 2- 35 وحدة من السكر .

3- متعددات الفركتوز Fructo-oligosaccharides (FOS) وهذه تزيد من تعداد البكتريا المنشطرة الذي يرافقه تقليل عدد البكتريا الممرضة مثل Fusobacteria , Clostridia , Bacteriodes . وهذه السكريات تستخدم من قبل البكتريا المنشطرة *Bif. infantis* ولا تستخدم من قبل البكتريا المعوية الاخرى مثل *E. coli* , *Lb. acidophilus* , *Ent . faecalis* .

4- متعددات الكلاكتوز Galacto-oligosaccharides وتوجد في حليب الام وأحياء اخرى ويشجع نمو البكتريا المنشطرة لذلك كثرت هذه البكتريا في امعاء اطفال الرضاعة الطبيعية ، كما ان المادة يمكن تحضيرها من اللاكتوز بمعاملات إنزيمية .

5- Galactosyl lactose سكر ثلاثي يوجد في حليب الام ، يمكن ان يصنع ويضاف الى خلطات الاغذية للرضع لتشجيع نمو البكتريا المنشطرة في الامعاء .

6- Palatinose سكر قليل التعدد يحوي على الفركتوز يستخدم كمحلي في الخلطات الغذائية والهدف زيادة تعداد البكتريا المنشطرة .

السكريات الثنائية وبدائلها :

وتستخدم هذه السكريات كمساعدات للعلاج الحيوي بدلا من السكريات قليلة التعدد المذكورة أعلاه ومنها المانيتول ، السوربيتول Sorbitol والزايليتوز Xylitol و Lactulose, Lactitol وغيرها . وتكون بطيئة الامتصاص في امعاء الانسان ولكن يمكن ان تخمر وتستهلك من قبل البكتريا حامض اللاكتيك والبكتريا المنشطرة في القولون ، والسوربيتول والمانيتول يمكن ان تشجع ايضا نمو البكتريا السالبة لصبغة كرام . وقد سمحت منظمة الصحة العالمية WHO باستعمال الكحولات المتعددة كمضافات غذائية دون تحديد الجرع اليومية مما يشير الى انها أمينة الاستعمال ، ولكن وجد ان إعطائها بكميات كبيرة تسبب الإسهال لذلك وجب التدرج باستعمالها .

ومن اهم السكريات في هذه المجموعة هو Lactulose (4-O-β-galactopyranosyl- D-fructose) لا يتحلل بالإنزيم β-galactosidase . والسكر لا يوجد في الحليب ولكن يوجد في منتجات الألبان التي تتعرض لمعاملات حرارية ، وبما انه لا يتأثر بإنزيم اللاكتيز أعلاه لذلك يبقى في الامعاء ويمكن ان تستهلكه البكتريا المنشطرة ويشجع نموها ويؤدي الى جعل فلورا الامعاء مشابه لفلورا أمعاء الأطفال ذوي الرضاعة الطبيعية .

والسكر الأخر القريب من السكر اعلاه هو Lactitol والذي له وضع مشابه في كونه يشجع نمو البكتريا المنشطرة لذلك يسمى او يعد من Bifidigenic factors .

واضافة الى ما ذكر فان الأحياء العلاجية تستطيع استهلاك سكريات اعلى من السكريات الثلاثية مثل السكريات الرباعية والخماسية الموجودة في الدكستران ، اما السكريات الاكثر تعددا مثل الاميلوز Amylose والسليلوز فلا تستطيع استهلاكها .

الفصل الخامس

تطبيقات استعمال الاحياء العلاجية

تطبيقات استعمال الاحياء العلاجية

هناك بعض الاحياء التي امتازت عن غيرها بكونها أحياء علاجية كفوءة ، ومنها بكتريا حامض اللاكتيك ذات التاريخ الطويل المعروف بأمانها وسلامتها وتعايشها مع الانسان وكذلك الحال مع البكتريا المنشطرة والتي استعملت في تطبيقات كثيرة ، وفيما يلي ملاحظات عن جنس العصيات اللبنية والبكتريا المنشطرة المستعملة في العلاج :

جنس العصيات اللبنية *Lactobacillus* : يضم الجنس مجموعة متباينة من البكتريا ويحوي على حوالي 54 نوع وتفرعاتها . الخلايا موجبة لصبغة كرام ، غير متحركة ، توجد بشكل خلايا مفردة او مزدوجة او بشكل سلاسل ، أشكال الخلايا من عصوية الى بيضوية Coccobacilli او عصيات اسطوانية ، والشكل يعتمد على عدة عوامل منها النوع والسلالة وكذلك عمر المزرعة ووسط التنمية وغيره من الظروف وهذه التغايرات ليست كبيرة مقارنة بما يظهر في البكتريا المنشطرة .

ينتشر افراد الجنس في البيئة التي تمتد من سطوح النباتات Epiphytes الى امعاء العديد من اللبائن . واكثر البيئات ملائمة هو الحليب لما يحتويه من مواد غذائية وعوامل نمو ورقم هيدروجيني وجهد اكسدة واختزال ملائم .

الجنس ينقصه مركب البروفيرين لذلك يخلو من الكاتيلز والسايتوكرومات ، وهو محب لتهوية قليلة وينشط النمو تحت الظروف اللاهوائية. الجنس من الاحياء مجبرة التخمر ومعظم أفراد الجنس متجانسة التخمر ويحوي على أحياء متباينة التخمر .

متطلبات الجنس الغذائية كثيرة جدا ومعقدة وربما فاقت متطلبات جسم الانسان لذلك وجب تزويدها بالمواد الغذائية للوصول الى أفضل نمو .

اما المتطلبات الحرارية فهي مختلفة ، فالبعض محبة لحرارة متوسطة Mesophiles وتعيش بين 30-40 ْ م ، ويضم الجنس انواع ينشط نموها بدرجة حرارة 15 ْ م ، واخرى يكون أفضل نمو لها عند 55ْم .

اما من ناحية الحموضة فأفراد الجنس صامدة للحموضة Aciduric وأفضل رقم هيدروجيني لنموها 5.5-6.2 ، ولا تستطيع ان تبدأ النمو عندما يكون الرقم الهيدروجيني للوسط متعادل .

أعيد تصنيف الجنس اكثر من مرة والتصنيف في الوقت الحاضر يعتمد على الصفات الفسلجية إضافة الى التوصيف الجزيئي مثل استعمال توالي القواعد النتروجينية في الحوامض

النووية خاصة الجينات المسئولة عن rRNA وبشكل أدق 16S rRNA باستعمال التقنيات الحديثة المساعدة مثل PCR .

ويقوم جنس العصيات اللبنية بالعديد من الفعاليات الايضية التي يمكن المرور عليها باختصار والتعرض لبعض تفاصيلها في الفصول القادمة ومنها :

1- اختزال مجموعة النترو Nitro group في 4-Nitrobenzoic acid كما انها تؤدي الى تفكيك مركبات Nitrosoamines .

2- اختزال أواصر الازو Azo في المثيل الأحمر و Acid yellow وغيرها من المركبات الحاوية عليها .

3- تقوم باختزال الأواصر المزدوجة في Cinnamic acid (Phenylpropionic acid) و 3-hydroxycinnamic acid وبعض المركبات الاخرى الحاوية على الاصرة المزدوجة .

4- تقوم العصيات ايضا بتفاعلات إزالة الهيدروكسيل Dehydroxylation مثل إزالتها من المركب *meta*- hydrophenyl propionic الموجود في حامض ألكافيك Caffeic acid ولكن بمساعدة بعض إفراد المسبحيات من مجموعة N-group (حسب تصنيف لانسفيليد) .

ومن أفراد الجنس المهمة جدا من النواحي العلاجية البكتريا *Lb. casei* السلالة Shirota وهي معزولة من غائط الإنسان وتستعمل بكثرة في اليابان . وكذلك البكتريا *Lb. acidophilus* وقد استعملت في علاج الإنسان ومن أهمها سلالات ذات أصل بشري وهي *Lb. acidophilus* Lc750 و NFCO1748 *Lb. acidophilus* . فالسلالة الأولى لها القابلية على استعمار أمعاء الإنسان والالتصاق بها بقوة أكثر من باقي السلالات . وكذلك تلتصق الى خط الخلايا البشرية Caco-2 المستعملة في الدراسات .

فعند تناول الإنسان مستحضر البكتريا بشكل مجفد او منتج لبني يمكن بعد مدة عزلها من الغائط بمستوى يصل الى 10^6 وحدة تكوين المستعمرات /غم من الغائط . وللسلالة قابليات كثيرة فهي تنتج البكتريوسينات ذات التأثير القاتل لمدى واسع من البكتريا .

والبكتريا تعطي مستعمرات بمواصفات خاصة على وسط MRS (الخاص بتنمية بكتريا حامض اللاكتيك) وكذلك اكر عصير الطماطة Tomato juice agar الخاص بتنمية العصيات اللبنية والذي يسهل تميزها في النماذج خاصة الغائط الذي يحوي على إعداد كبيرة وانواع كثيرة من البكتريا .

ومن قابليات *Lb. acidophilus* إزالتها لثاني أوكسيد الكربون من بعض الحوامض الامينية مثل الهستيدين بتأثير إنزيم Histidine decarboxylase مما يسهل تشخيصها . وللنوع القابلية على اختزال أواصر الازو في بعض الأدوية المستعملة في علاج التهابات القولون المتقرحة مثل

Azulfidine وبذلك تقلل من التأثيرات الجانبية ، كما أنها تحلل حوالي 28% من المضاد الحيوي الكلوروفينكول في الامعاء وتحلل ايضا المضاد ألميكروبي Phathalyl sulfathiazole بنسبة تصل الى 18% .

والنوع له القابلية على تحليل Tartrazine الصبغة القرمزية المستخرجة من القطران والمستعملة في تلوين الأغذية والتي أثبتت الدراسات ان لها القابلية على توليد السرطانات في الحيوانات إضافة الى تحسس نسبة معينة من الناس لها وتحلل ايضا المثيل الأحمر الحاوي على أصرة الازو وتشارك في هذه الفعالية بعض أنواع الجنس مثل *Lb. helveticus* و*Lb. salivarius* ولكنها بكفاءة اقل .

وقد وجد ان سلالات مختلفة من البكتريا المعزولة من أطفال رضع في مدينة بغداد لها القابلية على استهلاك حامض الاوروتيك Orotic acid المشابه للقاعدة النتروجينية اليوراسيل الذي يكثر في حليب الابقار ولا يوجد في حليب الام ويعد Vit. B13 بالنسبة للبكتريا ولكنه يؤدي الى اضطرابات ايضية في الإنسان وخاصة الرضع . إضافة الى ذلك وجد ان بعض العصيات تكون من النوع المعتمد على حامض الاوروتيك Orotic – acid dependent . ولم تلاحظ صفة استهلاك الحامض في مكونات بادئ اللبن التقليدي *Lb. bulgaricus* و *S. thermophilus* وكذلك في المكورات اللبنية

البكتريا المنشطرة Bifidobacteria : وتعد من الاحياء العلاجية المهمة ، وقد مر ذكر التفاصيل الخاصة بها ، ويمكن ذكر بعض فوائد البكتريا من النواحي العلاجية :

1- البكتريا تنتج العديد من الإنزيمات الخاصة بها .

2- تؤثر في وظيفة ومظهر جدران القناة الهضمية فهي تساعد في دورة انقلاب ونضوج الخلايا المعوية ، كما إنها تشارك في تفكك واستبدال المخاط المعوي ، ولها تأثيرات خاصة على الجهاز المناعي في الامعاء .

3- لها تأثير تغذوي ايجابي إذ أنها تنتج العديد من الفيتامينات (جدول 10) وكذلك تنتج عددا من الحوامض الامينية مثل الالنين والفالين وحامض الاسبارتيك والثريونين . وتنتج حامض اللاكتيك يساري الدوران(+) L الذي يمثل بشكل كامل في جسم الإنسان ويؤدي الى تشجيع دورها التغذوي .

4- تفرز إنزيم اللاكتيز وبذلك تقلل من حالة عدم تحمل اللاكتوز .

5- تساعد في خفض الكولسترول .

6- تساعد في التقليل من حامض الاوروتيك الآتي الى الامعاء مع حليب البقر والذي ينعدم في حليب الأم .

وللبكتريا فوائد صحية أخرى :

تستطيع البكتريا المنافسة مع الاحياء الممرضة لاستيطان الإمعاء وتكون المنافسة على المواد الغذائية وكذلك على المستلمات للارتباط والالتصاق الى سطوح الخلايا الطلائية ، اضافة الى تغييرها البيئة في الامعاء ، فعند التخمير تنتج الحوامض العضوية مثل حامض اللاكتيك وحامض الخليك وهذا يؤدي الى خفض الرقم الهيدروجيني للأمعاء وبالتالي منع البكتريا غير المرغوبة من النمو .

ويلاحظ ان استيطان الامعاء من قبل البكتريا المنشطرة ينشط في حالة الرضاعة الطبيعية نتيجة لوجود بعض المركبات في حليب الام فقط والتي تعمل كمساعدات (كما مر ذكره) ، وعند نموها تؤدي الى حموضة الامعاء التي تعمل موقفات للبكتريا الاخرى Bacteriostatic ضد *E. coli* والبكتريا السالبة لصبغة كرام ، وعملية التحميض تكون ذات تأثير كبير على البكتريا السالبة لصبغة كرام ويكون حامض الخليك (*p*Ka 4.75) اكثر فعالية من حامض اللاكتيك (*p*Ka 3.08) . وتنتج البكتريا المنشطرة كميات كبيرة من حامض الخليك ويكون التأثير الأكبر للشكل غير المفكك ، فقد وجد ان 84 % من حامض الخليك و 1.1% من حامض اللاكتيك يكونان بشكل غير مفكك في الامعاء عند رقم هيدروجيني 5.8 ، وتنتج البكتريا المنشطرة حامض الخليك وحامض اللاكتيك بنسبة 3 : 2 . كما ان الحموضة المتولدة من تأثير البكتريا في الامعاء تؤدي الى زيادة حركة الامعاء الدودية والتي تؤدي الى التخلص من الاحياء الممرضة الموجودة .

وتؤثر البكتريا المنشطرة على ظاهرة انتقال او ازفاء الاحياء الممرضة Translocation الى الاعضاء الاخرى والذي يتداخل مع تأثير الجهاز المناعي . فقد لوحظ ان البكتريا *E. coli* المدخلة الى المعدة انتقلت الى الاعضاء الاخرى مثل الكبد والطحال والرئات ولكن استيطان الحيوان بالبكتريا المنشطرة قد أدى الى منع هذه الظاهرة والذي يعزى الى تقوية الجهاز المناعي اذ ان اعطاء البكتريا المنشطرة مثل *Bif. longum* يؤثر على المناعة الخلطية والخلوية .

وإضافة الى ما ذكر اعلاه فان بعض الأنواع تفرز البكتريوسينات التي تكون مقاومة للحرارة وثابتة بمدى واسع من الأرقام الهيدروجينية يصل من 2- 10 وتؤثر على البكتريا الموجبة لصبغة كرام مثل الكلوستريديا .

وتستعمل البكتريا المنشطرة في علاج العديد من الحالات واكثر السلالات المستعملة هي ذات اصل بشري ولكن عند الاستعمال لابد من وجود بعض المواصفات منها :

- العناية بانتخاب النوع وأهمها ان تكون ذات أصل بشري وذلك لتلافي رفض الجسم والجهاز المناعي لها ، اضافة الى احتمال وجود مستلمات لالتصاقها .

- o يجب ان يعنى بالتشخيص بشكل دقيق جدا للوصول الى السلالة لان هناك بعض السلالات (حالات قليلة جدا) تشير بعض التقارير الى أنها مرضية .
- o يجب ان تحدد فعاليتها خارج الجسم الحي وداخله وذلك لان السلالة الواحدة غير قادرة على القيام بكل الفعاليات المطلوبة من الاحياء العلاجية ، ويجب ان يكون الاختيار وفق المطلوب او اختيار خليط من السلالات للوصول الى الغرض المطلوب .
- o يجب ان تنتخب السلالات المتحملة للحموضة والأوكسجين .
- o تفضل السلالات الملائمة لعمليات التصنيع .

ويمكن وضع شروط أخرى وفق الحاجة .

ونظرا لتداخل الاحياء العلاجية مع جوانب مختلفة من فعاليات الجسم فيمكن توضيح بعض هذه العلاقات

اولا : علاقة احياء اللبن التقليدي مع الجهاز المناعي

مثلما ذكر سابقا ان للأحياء العلاجية تداخل كبير مع الجهاز المناعي ولعل الاحياء العلاجية لا تكون في متناول الجميع ولم تأخذ دورا كبيرا في المجتمعات لذلك سيكون مستهل الموضوع حول

اللبن Yoghurt.

فاللبن يعرف على انه منتج حليب متخثر نتيجة تخمرات بكتريا حامض اللاكتيك وبالتحديد *Lb. bulgaricus* , و *S. thermophilus* ويمكن ان ترفق معها انواع اخرى من البكتريا او انواع من الخمائر ، والمهم ان تكون البكتريا حية في المنتج النهائي وبكميات مناسبة أي لا تكون قد ماتت نتيجة للخزن الطويل عند استعملها لغرض العلاج .

والبكتريا المذكورة اعلاه وكذلك انواع اخرى من افراد بكتريا حامض اللاكتيك قد استعملت منذ القدم لإطالة مدة صلاحية الحليب وحفظه . وكل من الحليب واللبن الناتج من تخمره يحتويان على الفيتامينات والمعادن بشكل متشابه مع عدا بعض الاختلافات ، فاثناء التخمر يستهلك فيتامين B12 وكذلك فيتامين C الذي يتلف معظمه بالمعاملات الحرارية قبل اضافة البادئ Starter وينتج حامض الفوليك بعد التخمر اما الفيتامينات الاخرى فتكون الاختلافات فيها بسيطة .

اما المعادن فتكاد تكون متشابه ما عدا ايون الكالسيوم الذي يكون اكثر جاهزية في اللبن منه في الحليب ، وللايون ادوار مهمة في تركيب كازينات الحليب وثباتيتها . يحوي اللبن قليل من اللاكتوز نظرا لاستهلاكه من قبل البادئ لانتاج حامض اللاكتيك الذي يكون موجودا بوفرة في اللبن ، ولكن اللبن يحوي على نسبة مرتفعة نوعا ما من الكلاكتوز الذي تفرزه *S.*

thermophilus عند شطرها لسكر اللاكتوز واستعمالها للكلوكوز فقط للتخمر وافراز الشطر الاخر الى الوسط المحيط كما ذكر سابقا ، إضافة الى احتواء اللبن على كميات كبيرة من الببيتيدات والحوامض الامينية الحرة الناتجة من الفعاليات المحللة للبروتينات من قبل بكتريا البادئ ، وكذلك يحوي اللبن على الحوامض الدهنية الحرة .

ومنذ عام 1908 عندما لاحظ Metchnikoff ان *Lb. bulgaricus* تكبح جماح بكتريا التعفن والمنتجة للسموم وملاحظته لطول أعمار البلغاريين الذين يستهلكون اللبن بكثرة والدراسات جارية بشكل مكثف حول الموضوع . ولعله بالإمكان تفسير التأثيرات المتعددة للاحياء العلاجية هو نابع من تأثيرها على الجهاز المناعي ذو التشعبات والواجبات الكثيرة .

وفي مجال استعمال اللبن العادي Plain yoghurt وجد ان اعطائه عن طريق الفم او الحقن Parenteral يقوي المناعة غير المتخصصة ويعمل كمادة حاملة للمساعدات في الاستجابة المناعية للمستضدات المتخصصة . ومعظم الدراسات تشير الى ان بكتريا حامض اللاكتيك تؤثر على الجهاز المناعي من خلال التغييرات التي تحصل في بيئة القناة الهضمية ، ويعتمد تأثيرها على درجة تلامسها مع الأنسجة اللمفاوية أثناء استعمارها للأمعاء وعليه فان بقائها في القناة الهضمية يؤثر على قابلية تقويتها للمناعة .

وبكتريا بادئ اللبن التي انتخبت على أسس تصنيعية اكثر منها علاجية يلاحظ انها لا تقاوم حموضة المعدة مقارنة بالبكتريا *Lb. acidophilus* والبكتريا المنشطرة *Bif. longum* التي هي اكثر مقاومة من باقي انواع البكتريا المنشطرة . وفي الدراسات خارج الجسم وجد ان تعريض الخلايا المناعية المزروعة الى بكتريا حامض اللاكتيك ومنتجاتها يؤدي الى زيادة انتاج الأجسام المضادة والسايتوكينات وكذلك زيادة الفعالية الأبتلاعية ، اضافة الى زيادة فعاليات الخلايا التائية وفعاليات الخلايا القاتلة الطبيعية . هذا بالاضافة الى ان الدراسات على الانسان بإعطائه اللبن قد أدت الى نتائج مشابه مما يشير الى ان هناك بعض المكونات في اللبن غير البكتريا لها تأثيرات على الجهاز المناعي . وهناك العديد من الشواهد التي تشير الى ان استهلاك اللبن يؤدي الى قلة حدوث الأمراض ذات العلاقة بالجهاز المناعي مثل السرطان وأمراض الحساسية وبعض اضطرابات الجهاز الهضمي وربما كانت إحدى هذه المشاهدات هي مشاهدة العالم الروسي Metchnikoff المذكورة اعلاه .

ومجمل الدراسات التي اجريت على الانسان تشير الى ان لمكونات اللبن التقليدي تاثيرات على الجهاز المناعي يمكن ادراجها كالآتي :

زيادة انتاج السايتوكينات من قبل مزارع الخلايا اللمفاوية البشرية بوجود *Lb. bulgaricus , S. thermophilus* ومنها انتاج IFN-γ عند تحفيزها بالـ Con A وان العصيات كانت اكثر كفاءة في التحفيز من المكورات .

اما داخل الجسم الحي فقد وجد ان استهلاك اللبن لمدة طويلة قد زاد من انتاج سايتوكينات أخرى مثلIL-1β , IL-6 , IL-10 , IFN-γ, TNF-α ، وقد استعمل قياس السايتوكينات مباشرة ما عدا IFN-γ الذي تكون كمياته قليلة في بلازما الدم لذلك يقاس بقياس الانزيم الذي يستحث به (IFN-γ- 2',5' A synthetase) .

وكان مجمل التوجهات العامة عند استطلاع الدراسات في الحيوان والانسان تشير الى ان اللبن يحفز بعض المؤشرات خارج الجسم الحي للاستجابات المناعية منها :

- زيادة انتاج السايتوكينات .
- زيادة فعالية الخلايا االابتلاعية .
- زيادة استجابة الخلايا للمشطرات .

كما ان اللبن يمكن ان يستعمل في الأشخاص منقوصي او معلولي المناعة Immunocompoimized مثل المرضى وكبار السن لتحسين أداء الجهاز المناعي .

مكونات اللبن المؤثرة في الجهاز المناعي

في اغلب الاحيان يكون نجاح الاحياء العلاجية في الجهاز الهضمي معتمدا على كون الخلايا حية لان ذلك يوفر لها فرصة التكاثر والالتصاق مقارنة بالخلايا الميتة التي تنجرف بسهولة من الامعاء . ومن جهة ثانية فان تحفيز الجهاز المناعي يحتاج الى تلامس البكتريا مع مكوناته مثل GALT في الامعاء إضافة الى مدة ودرجة التلامس . ومكونات جدران البكتريا الموجبة لصبغة كرام وهي الببتيدوكلايكان والسكريات المكوثرة وحامض التيكوئيك كلها لها صفات تحفيز المناعة إضافة الى المستضدات السايتوبلازمية في بعض سلالات بكتريا حامض اللاكتيك . ومن جهة اخرى فان مكونات اللبن غير البكترية والمكونات التي تنتج من تخمير الحليب يمكن ان تشارك في الفعالية التحفيزية للجهاز المناعي ، فالببيتيدات والحوامض الأمنية الناتجة من التخمر وجد ان لها تأثير محفز للاستجابة المناعية ، كما ان بروتينات اللبن الأخرى مثل الشرش والكالسيوم وبعض الفيتامينات والعناصر النادرة يمكن ان تؤثر على الجهاز المناعي (يراجع موضوع الببيتيدات الفعالة) .

المكونات البكتيرية في اللبن

كما ذكر أعلاه ان اللبن التقليدي يصنع من *Lb. bulgaricus , S. thermophilus* وهذه لا تقاوم أملاح الصفراء في الامعاء والرقم الهيدروجيني المنخفض في المعدة لذلك تضاف اليه بعض

الاحياء للاغراض العلاجية التي تكون ذات اصل بشري مثل , *Lb. casei* و *Lb. acidophilus* وانواع من البكتريا المنشطرة . وعلى العموم عند استعمال اللبن التقليدي يؤدي الى استجابات مناعية قد تعزى الى مكونات الجدران الخلوية وذلك لان البكتريا تصل الامعاء ميتة ، والجدران في مجموعة بكتريا حامض اللاكتيك تحوي على البيبتيدوكلايكان بنسبة تصل الى 30-70 % من المكونات الجدارية مثل السكريات المكوثرة وحامض التيكوئيك .

والبيبتدوكلايكان هو بيبتيدات مرتبطة الى السكريات تنفصل من الجدران الخلوية بتأثير الإنزيمات الحالة مثل اللايزوزايم Lysozyme الذي تنتجه الخلايا المعوية (خلايا بانيث) Paneth cells ويمكن ان يطلق البيبتيدوكلايكان و Muramyl dipeptides (MDP) وهو مركب مشتق من البيبتيدوكلايكان وزنه الجزيئي اقل من البيبتيدوكلايكان . والمعروف ان البيبتيدوكلايكان له تأثير العامل المساعد على الجهاز المناعي اذ يرتبط بمستلمات خاصة على سطوح الخلايا اللمفاوية والخلايا الابتلاعية الكبيرة ، ولذلك فان بكتريا حامض اللاكتيك التي تصل الامعاء والحساسة للايزوزايم يمكن ان ينطلق البيبتيدوكلايكان منها ويمارس فعاليته كعامل مساعد مثالي عند السطوح المخاطية في الامعاء .

كما ان MDP المذكور يمكن ان يؤدي عدة فعاليات:

- يحفز الخلايا الابتلاعية الكبيرة على إطلاق IL-1 اللازم لتنشيط الخلايا التائية .
- يحث تخليق وإنتاج IL-4, IFN-γ من اللمفاويات .
- يحفز انتاج TNF-α , Il-6, IL-1 من الخلايا وحيدة النواة .

وفي خارج جسم الكائن الحي فان MDP الذي يعد اهم مكونات البيبتيدوكلايكان يزيد من فاعلية الخلايا التائية على انتاج IFN-γ ويتوقف الانتاج عند اضافة الاجسام المضادة للـ CD4 (Anti-CD4) الذي يؤدي الى اضمحلال الخلايا التائية $CD4^+$ T cells ، وكذلك يقل الانتاج عند تلاشي الخلايا وحيدة النواة ، وهذا يشير الى ان المركب يحفز الخلايا متعددة النوى PMNCs لإنتاج الانترفيرون – كاما من خلال تكوين معقدات مع مستلمات المستضدات على سطوح الخلايا CD4 . ومن هنا يعتقد ان MDP هو المركب الذي تميزه الخلايا وحيدة النواة ويقدم الى الخلايا اللمفاوية $CD4^+$.

وقد وجد ان تاثير الانزيمات على الجدران الخلوية لبكتريا حامض اللاكتيك يؤدي الى :

-1 زيادة مناعة المضيف غير المتخصصة ضد الخلايا الورمية وبعض الاحياء الخطرة مثل *L. monocytogenes* .

-2 زيادة انتاج السايتوكينات من قبل PMNCs .

-3 زيادة قابلية الخلايا اللمفاوية في جيوب باير على التكاثر .

4- تؤثر على الحساسية المتأخرة DTH أي أنها تؤثر على الخلايا التائية .
5- تؤدي الى زيادة بعض الأجسام المضادة .

وإضافة الى الببتيدوكلايكان ونواتج تحلله الإنزيمي وجد ان حامض التيكوئيك يؤدي الى زيادة انتاج IL-1 , IL-6 , TNF-α خارج الأنظمة الحية في مزارع الخلايا وحيدات النواة .

اما عند استعمال المكونات السايتوبلازمية لبكتريا حامض اللاكتيك فقد وجد ان التاثير يعتمد بشكل كبير على السلالة .

المكونات غير البروتينية في اللبن :

بالرغم من تشابه اللبن مع الحليب في الكثير من الصفات الا ان هناك تغيرات تحصل في الحليب وتحوله الى لبن منها ما ذكر سابقا مثل نقصان اللاكتوز وفيتامين B12 وكذلك نقصان B6 ، الا انه تحصل زيادة في الببتيدات والحوامض الامينية والحوامض الدهنية وحامض الفوليك والكولين . ومن جهة أخرى فان الحليب يحوي على كازينات الكالسيوم في حين يحوي اللبن على لاكتات الكالسيوم بالإضافة الى حدوث تغيرات في المواد الغذائية وغير الغذائية ولكن هناك العديد من المركبات الفعالة تتولد من التخمر .

فمن ناحية البروتينات يلاحظ ان بروتيزات الامعاء تكون متخصصة في حين ان بروتيزات البكتريا تكون غير متخصصة لذلك فأثناء التخمر تنطلق كميات كبيرة من الببتيدات والحوامض الامينية بتأثير البروتيزات البكترية مؤدية الى تغيير الصفات الفيزوكيماوية لبروتينات الحليب . ويعتقد ان الببتيدات الناتجة أثناء تخمر الحليب يمكن ان تحسن من أداء الجهاز المناعي (كما ذكر انفا) . فقد وجد ان البروتينات المتحللة بشكل كبير من الحليب تزيد من قابلية الابتلاع من قبل خلايا الابتلاع الكبيرة الموجودة في الحويصلات الرئوية Pulmonary alveolar macrophages في الفئران . وهذا يأتي تدعيما للدراسات التي أشارت الى ان الببتيدات السداسية عند حقنها في وريد الفئران تؤدي الى مقاومتها للإصابة بـ *Klebsiella pneumoniae* ، وفي خارج الجسم الحي فان مثل هذه الببتيدات الصغيرة تزيد من قابلية الخلايا الأبتلاعية المأخوذة من غشاء الخلب للفئران وكذلك تحفز تكاثر ونضوج الخلايا التائية والخلايا القاتلة الطبيعية لتساعد في دفاع الجسم ضد عدد كبير من البكتريا خاصة المعوية .

بروتينات الشرش Whey proteins :

بروتينات الشرش سواء الطبيعية او الممسوخة بالحرارة تحوي على نسب عالية من السستئين مقارنة مع أي من البروتينات القابلة للأكل وربما ساعد ذلك في تحفيز الجهاز المناعي بواسطة اللبن ، فالسستئين يعد من المنظمات لتخليق Glutathione الذي يكون مهما لإزالة

سمية العديد من المواد المسرطنة سواء كانت داخلية او خارجية المنشأ وكذلك في التخلص من الجذور الحرة . كما ان الكلوتاثايون يلعب دورا مهما في تنظيم فعالية الجهاز المناعي . وقد وجد ان هبوط محتوى الخلايا من الكلوتاثايون يؤدي الى إحباط استجابة اللمفاويات للمشطرات وذلك بمنع الخلايا من الدخول الى طور تخليق الحوامض النووية S phase في دورة الحلية ، وتقل ايضا سمية الخلايا المعتمدة على الأجسام المضادة، اضافة الى انخفاض سمية الخلايا التلقائية وكذلك تمنع فعالية LAK (Lymphokine – activated killer cells) التي تشتق او تتطور من الخلايا القاتلة الطبيعية بتأثير IL-2 . ولذلك فإطعامه للفئران الصغيرة يؤدي الى :

1- زيادة استجابة الجسم لبعض البروتينات مثل ألبومين البيض .

2- زيادة فعالية الحساسية المتأخرة .

3- زيادة استجابة وتكاثر الخلايا التائية في الطحال بتأثير المشطر Con A .

وتشير الممارسات والدراسات العامة الى ان بروتينات الشرش تقلل من حدوث الإصابات والأمراض الورمية وتزيد من طول العمر .

الدهون :

في أثناء التخمر تحصل العديد من التغيرات على الدهون ، فالحليب يحوي على Conjugated linoleic acid (CLA) وهو مركب له فعالية محفزة للجهاز المناعي وله صفات مضادة للسرطانات . ويوجد المركب في لحوم الأغنام والأبقار ومنتجات الألبان ويمكن لبكتريا الكرش Rumen bacteria تحويل حامض اللنوليك بالهدرجة الحيوية Biohydrogenation الى CLA ومثل هذه الهدرجة يعتقد انها تحدث لدهن الحليب أثناء التخمر . كما ان هناك انواعا من الحوامض الدهنية يمكن ان تتكون بعد التخمر اعتمادا على مصدر الحليب والسلالة المستعملة في التخمر . وفي هذا المجال وجد ان هناك زيادة في Oleic acid, Stearic acid في الحليب ألبقري بعد تخميره بالبادئ التقليدي (*Lb. bulgaricus* , *S. thermophilus*) والتي تعزى بشكل رئيس الى تشبع حامض Linoleic acid . واللبن يحوي على مستويات عالية من CLA مقارنة بالحليب الذي استعمل في تحضيره .

الايونـــات

ان تخمر الحليب يؤدي الى إذابة ايونات Ca^{++} وMg^{++} والفسفور وتحدث أيضا إذابة جزئية للعناصر النادرة ، ولذا فان التخمر يزيد من الجاهزية الحيوية لهذه المعادن . فالكالسيوم والفسفور هي أكثر جاهزية حيوية في اللبن مقارنة بالحليب ، والكالسيوم يحسن من أداء وظائف

الجهاز المناعي بمساعدته على ربط اللكتينات Lectins باللمفاويات ، كما انه يشجع انتاج IL-2 وزيادة فعالية الخلايا اللمفاوية السامة تجاه الخلايا الورمية .

وقد وجد ان المواد الناضحة Dialyzates وكذلك المواد الناتجة من عملية التبادل ألايوني لمنتج اللبن لها فعالية عالية ضد الأورام في جسم الفئران وقد تعود هذه الى زيادة الفعالية المناعية غير المتخصصة . كما ان راشح اللبن ورائق الطرد المركزي المزالة منه الخلايا يؤدي الى زيادة انتاج IFN-γ وزيادة فعالية الخلايا القاتلة الطبيعية في دم الإنسان المحيطي .

كل هذه الدلائل تشير الى ان مكونات اللبن من غير البكتريا لها ايضا تأثير محفز للجهاز المناعي . إضافة الى ان اللبن غذاء ذو قيمة غذائية نوعية جيدة وعالية ، اذ يحوي على البروتينات والفيتامينات والمعادن الضرورية للحفاظ على استجابات مناعية مثلى .

علاقة بكتريا حامض اللاكتيك العلاجية مع الجهاز المناعي :

ما ذكر أعلاه كان خاصا بالبادئ التقليدي *Lb. bulgaricus , S. thermophilus* وهي أحياء لا علاجية ولا يمكن ان تعبر حموضة المعدة ولا تقاوم أملاح الصفراء . أما الاحياء العلاجية التي تسوق على شكل مجفد بشكل أساسي وأكثرها تعود الى جنس العصيات *Lactobacillus* spp والمكورات المعوية *Enterococcus* spp والبكتريا المنشطرة فقد وجد ان لها تأثيرات على الجهاز المناعي سواء الشطر الخلوي منها او الشطر غير الخلوي .

فالبكتريا التي تعبر وتصل القناة الهضمية تلتصق بالخلايا الطلائية لجدران القناة ويمكن ان ترتبط بالخلايا M- cells . وأشارت الدراسات في الحيوان ان GALT تتحفز بواسطة بكتريا حامض اللاكتيك مؤدية الى تحفيز انتاج السايتوكينات والأجسام المضادة sIgA وكذلك تزيد من فعالية الانقسام لخلايا جيوب باير PP cells وخلايا الطحال . والحقيقة ان اغلب هذه الفعاليات تكون معتمدة على السلالة .

فمثلا وجد ان فعاليات خلايا الدم البيض الأبتلاعية تزداد وخاصة الخلايا المحببة عند استعمال حليب مخمر بسلالات من *Bifidobacterium* , *Lb. acidophilus* . كما وجد ان رائق النمو الخالي من الخلايا لكل من البكتريا *Lb. casei* , *Lb. acidophilus* له تأثيرات ايجابية كبيرة على اضطرابات القناة الهضمية وكذلك السرطانات

كما ان خلاصات سايتوبلازم بعض البكتريا العلاجية مثل *Lb. acidophilus* و *Bif. longum* تزيد من استجابات جيوب باير وكذلك تزيد من الفعالية الأبتلاعية خارج الجسم ، اضافة الى ان خلاصة السايتوبلازم والتي هي خالية من السكريات المكوثرة (الموجودة في

الجدران الخلوية) لبعض سلالات *Lb. acidophilus* تزيد من القابلية الأبتلاعية للخلايا الأبتلاعية الكبيرة .

وقد وجد ان راشح النمو او رائق نمو العديد من العزلات المحلية في بغداد والتي شخصت على أنها *Lb. acidophilus* والمعزولة من أطفال رضاعة طبيعية قد أثرت بشكل كبير على فعاليات الخلايا التائية او غيرها وكذلك أثرت على تحولاتها ، مما يؤكد الحقيقة اعلاه من ان التأثيرات العلاجية تعتمد بشكل كبير على السلالة .

أمراض الحساسية :

وهي من الأمراض التي لها علاقة مباشرة بالجهاز المناعي والتي استعملت البكتريا العلاجية في التخفيف من وطئتها ، ومنها التهاب الجلد التأتبي Atpoic dermatitis والحساسية الأنفية Allergic rhinitis والربو Asthma وغيرها ، والحساسية تمثل تضخيم لعدم التوازن المناعي في استجابته للمحسسات البيئية والغذائية ، ومثل هذه الأمراض في تزايد كبير في العالم ينذر بالخطر خاصة في العالم الغربي وهو اقل وطأة منه في الدول النامية ، وقد وجد ان هذا الاختلاف يعود الى قلة الضغوط الميكروبية على الجسم في الدول الغربية وخاصة أثناء الحياة المبكرة للرضيع وكذلك الطفولة المبكرة نتيجة للإفراط في التعقيم واستعمال المضادات الميكروبية . فتعريض الشخص لمحفزات ميكروبية ملائمة تكون ضرورية لموازنة الخلايا التائية Th2 , Th1 وبالتالي نمو الطفل نحو حالة عدم تطور أمراض الحساسية التأتبية وبخلافه فان ذلك يعني عدم تعليم وتدريب الجهاز المناعي .

ويعود موضوع الفلورا الطبيعية يفرض نفسه من جديد فان الاختلافات في تركيبة الفلورا الطبيعة (الذي تناولته الفصول الأولى من الكتاب) قد يكون من الأسباب المهمة في حصول الحساسية ومن ذلك التوازن بين البكتريا المنشطرة والكلوستريديا الذي يبدو انه من العوامل المهمة في تهيئة الشخص للإصابة بالحساسية ، اذ ان أطفال رضاعة الثدي يكون عنهم تعداد البكتريا المنشطرة كبير ويكون حصول الحساسية لديهم اقل بكثير من أطفال الرضاعة او التغذية الصناعية اللذين يكون تعداد الكلوستريديا عندهم عاليا .

ومن المعروف ان الحساسية ترتبط بعض انواعها (النوع الاول) بشكل مباشر بالاجسام المضادة IgE الذي يتوسط في اظهار الحساسة المفرطة بارتباطها مع المستلمات FcεR1 على سطوح الخلايا الصارية . وتتأثر كمية IgE بالاعتماد على سايتوكينات الخلايا التائية المساعدة فالـ Th2 تنتج IL-4 الذي يعمل على تنظيم نسبة IgM الى IgE في حين ان IFN-γ المنتج من الخلايا Th1 يمنع هذا التوازن ، وأعطاء اللبن بكميات كبيرة يؤدي الى زيادة كمية IFN-γ ولكن يمنع إفراز IL-5 , IL-4 وبهذا يمنع بشكل كبير توليد IgE المتخصص للمستضدات في

الخلايا اللمفاوية المحفزة بألبومين البيض . أي بمعنى آخر ان بكتريا حامض اللاكتيك تقلل من انتاج IgE وبذلك فهي يمكن ان تقلل من الحالات التي يعمل فيها هذا النوع من الاجسام المضادة مثل الربو ، اضافة الى امكانية تقليلها لاعراض الحساسية الاخرى بصورة عامة .

والدراسات التي اجريت في هذا المجال تناولت العوائل المرشحة للإصابة بالامراض التأتبية Atpoic diseases فلوحظ ان اعطاء الام العصيات اللبنية السلالة GG قبل الولادة بأسبوعين ثم لمدة ستة اشهر بعد الولادة ادى الى انخفاض الإصابة بالاكزيمة التأتبية Atpoic eczema في السنتين الاولى الى النصف من الحالات المدروسة مقارنة بمجموعة السيطرة ووجد ان تأثير السلالة GG يمتد الى اربع سنوات من سنوات المتابعة ، اذ تشجع هذه السلالة انتاج IL-10 والسايتوكينات الاخرى كما انها تشجع انتاج الاجسام المضادة للـ Anti-IgE) IgE(إضافة الى تحوير فعاليات Th2, Th1 .

اما بالنسبة للحساسية الغذائية Food allergy فإعطاء الأحياء العلاجية من مجموعة بكتريا حامض اللاكتيك يكون تأثيرها في اكثر من جانب ، فهي تزيد من افراز sIgA الذي يحافظ على نضوحية الامعاء الدقيقة بشكل طبيعي ويؤدي الى منع امتصاص المستضدات او المحسسات الغذائية والذي يكشف عنه بانخفاض تراكيز TNF-α و α – antitrypsin في الغائط وينعكس هذا بتقليل الالتهابات الجلدية المتوقعة مع الحساسية الغذائية لكثير من الاغذية . فالسلالة GG يمكن ان تقلل من Atpoic eczema لدى الاطفال اللذين لديهم حساسية لحليب البقر .

وفي مجال الحساسية الغذائية ايضا فان مداخلات الاحياء العلاجية (بكتريا حامض اللاكتيك) مع الجهاز المناعي انها تحور الخلايا المسئولة عن الحساسية وهي الخلايا التائية المنظمة Tr إضافة الى تعديل التاثيرالمنظم الذي تظهره الخلايا التائية المساعدة Th1 ، فالسلالة GG تقوم بافراز جزئيات تقوم بإخماد استجابة وتكاثر اللمفاويات الخاصة بالحساسية ، وعليه فان العصيات اللبنية الموجودة في القناة الهضمية تقوم بهذه المهمة في الحالات الطبيعية .

اما علاقة الاحياء العلاجية بالسايتوكينات ذات العلاقة بالحساسية فالاحياء العلاجية او الخلايا المقتولة منها فانها تحفزانتاج IL-12 الذي يعيد التوازن الى الجهاز المناعي ويقلل من أعراض الحساسية ، والانترلوكين يثبط الخلايا التائية المساعدة Th2 ويمنع تخليق IgE بطريقة مشابهة لاستعمال الانترلوكين المأشوب (Recombinant IL-12) وبانخفاض مستويات IgE يزداد IgG_1 ، كما ان إخماد فعالية Th2 يرافقه قلة انتاج للانترلوكينات IL-5 , IL-4 .

ومن الاحياء التي لها القابلية على انتاج IL -12 بعض سلالات *Lb. gasseri, Lb. acidophilus* المقتولة بالحرارة مقارنة بعصيات اخرى عند إعطائها عن طريق الفم ، وان القابلية تتناسب طرديا مع كمية الببتيدوكلايكان ، وقد لوحظ ان معاملة مستحضرات العصيات اللبنية بإنزيم N- acetyl- muramidase أدى الى تقليل انتاج الانترلوكين ، لذلك فان مثل هذه البكتريات مرشحة لتحسين وتقليل امراض الحساسية .

ان علاقة امراض الحساسية في الاطفال تعود الى ما موجود من فلورا مهبل الأم Vaginal flora ، فإذا استعمر المهبل بالعنقوديات ورافقه استعمال المضادات الحيوية أثناء الحمل فانه يؤدي الى ظهور الربو عند الأطفال .

ولذلك اقترح انه بالاعتماد على الحالة وحالة الجهاز المناعي للمريض فانه يمكن تشجيع الجهاز المناعي نحو النواحي الايجابية وتخفيض الفعاليات خلال الإصابات والحساسية المفرطة .

الفصل السادس

القابلية المضادة للتطفير والتسرطن للاحياء العلاجية

القابلية المضادة للتطفير والتسرطن للأحياء العلاجية

من المعروف ان بعض الأغذية تحوي على مواد مضادة للتطفير والتسرطن ولكن في الوقت نفسه تحوي على بعض المطفرات والمسرطنات وتكون هذه في حالة موازنة في تاثيرها على الإنسان والحيوان ، والذي يساعد في اظهار الجوانب الايجابية هو الجهاز المناعي لذلك عند اختلاله عند الكبر او المرض فان الجوانب السلبية يمكن ان تبرز وتتم بعدة وسائل . وهذا يعني ان المطفرات والمسرطنات لا يمكن تجنبها في الحياة ، فمثلا مركبات N-nitrosamines والتي لها علاقة بسرطانات الانسان تدخل جسمه مع الاغذية خاصة البروتينية المطبوخة مثل اللحم وكذلك يمكن ان تأتي مع بعض الخضر ولذا فأن حوالي 70 % من السرطانات تولدها الأغذية ، ولذلك سعت الجهود الى إزالة المطفرات و المسرطنات من الاغذية والبيئة بعد تشخيصها .

وتساعد الفلورا الطبيعية في أمعاء الانسان والحيوان على التقليل من خطر المواد بعدة وسائل ، فعملية ربط المواد الضارة تمثل اهم الآليات ' فأحياء الامعاء يمكن ان ترتبط بالأمينات متباينة الحلقات Heterocyclic amines الموجودة في الغذاء او تقوم بتفكيكها للتخلص من أثرها الضار . ومثل هذه الفعاليات المضادة للمواد المسرطنة تقوم بها مجموعة البكتريا الموجبة لصبغة كرام وكذلك الخمائر وعدد قليل من البكتريا السالبة لصبغة كرام . وأكثر الآليات فاعلية هي الارتباط Binding خصوصا للمكوثر ألجداري البيبتيدوكلايكان فمثلا المكوثر ألجداري للبكتريا *Rhodococcus lentifragmentus* له تأثير محبط للأورام .

كما ان المكوثر ألجداري للبكتريا *Brevibacterium divaricatum* يمنع نمو الخلايا السرطانية b-16 melanoma و Fibrosarcoma Meth A عند زراعتها في الفئران . وبعد تجزئة المكوثرات الجدارية وجد ان البيبتيدوكلايكان هو الأقوى في التاثير من السكريات المكوثرة المشتقة مثل Arabinogalactan –Peptidoglycan .

ولبكتريا حامض اللاكتيك دورا مهما في هذا المجال اذ تقلل من خطر الإصابة بالسرطان من خلال عملية كبح التطفير Antimutagenesis وذلك بتعطيل المطفر في الامعاء او امتزازه Adsorption اضافة الى انتاج المواد التي يمكن ان تمنع تداخل المطفرات الكيماوية مع DNA و بالتالي تقلل من خطر التسرطن وذلك لان تدمير DNA يعد من الخطوات المبكرة لعمليات التسرطن ، واشارت الدراسات في الحيوان ان بكتريا حامض اللاكتيك لها تاثير كبير في تقليل السمية الجينية Genotoxicity ، اضافة الى تاثيرها على الجهاز المناعي وتحفيزه .

فعاليات بكتريا حامض اللاكتيك في مجال التضاد مع المطفرات والمسرطنات

قياس القابلية المضادة للتطفير يتم في اغلب الاحيان باستعمال نظام أيمس ، اما القابلية التسرطنية فتدرس في الحيوانات وفيما يلي نبذة بسيطة عن نظام أيمس المستعمل .

نظام أيمس Ames system

نظام بكتيري يستعمل لتحديد والكشف عن المواد المطفرة والمسرطنة خارج الأنظمة الحية . ويتكون من طفرات عوز غذائي للهستيدين من البكتريا *Sal. typhimurium* . فالبكتريا الطبيعية Prototroph يمكن ان تنمو على الوسط الغذائي الأدنى Minimal medium ، اما طفرات العوز الغذائي His^{-} لا يمكن ان تنمو على الوسط الغذائي الأدنى ألا بإضافة الهستيدين . وبدأ استعمال النظام في أوائل سبعينات القرن الماضي في جامعة كاليفورنيا من قبل د. بروس أيمس (Bruce Ames) ومعاونيه . ويتكون اوبرون الهستيدين من حوالي تسع جينات ، تم أحداث طفرات فيه كل طفرة يمكن ان تحدد نوعية المطفر في حالة الاستجابة مثل المطفرات التي تؤدي الى طفرات إزاحة الإطار Frame shift mutants او غيرها .

وقد طرأت على النظام تغيرات كثيرة لغرض تحسين أداءه مثلا اشتقت الطفرة *raf* التي حذف فيها جزء من الدهون السكرية في الأغشية الخارجية لغرض تسهيل دخول المطفرات الى الخلية وتكون الطفرات حساسة لصبغة البلور البنفسجي Crystal violet ، اضافة الى احتوائها على بلازميد يحمل صفة المقاومة للامبسيلين لتحسين أدائها . وقد انتشر استعمال النظام لغرض تحديد المطفرات في الأغذية او البيئة او لغيره من الأغراض على المستوى العالمي وذلك لسهولة استعماله ولتناسق النتائج التي يتم الحصول عليها . ويستعمل بصورة مباشرة او غير مباشرة وذلك باستعمال S_9 وهو خلاصة أكباد الجرذان المحرضة التي تحوي على العديد من الإنزيمات المؤكسدة التي تساعد في تحويل المواد غير المطفرة الى مواد مطفرة .

وأكثر السلالات استعمالا TA100 *Sal. typhimurium* او السلالة TA98 وكذلك السلالة TA97 اضافة الى طفرات اخرى . وقد استعمل في جامعة بغداد لتحديد العديد من المطفرات مثل صبغات الشعر وغيرها من مواد التجميل الكيماوية وأيضا لتحديد صلاحية المضافات الغذائية والمبيدات المستعملة في حقل الزراعة وأغراض أخرى .

آليات التاثير على المطفرات والمسرطنات

تؤدي بكتريا حامض اللاكتيك هذا الدور بعدة آليات :

1- التأثير على الإنزيمات ، فأمعاء الإنسان وخاصة القولون تحوي البكتريا المسرطنة مثل Bacteriodes وبعض Eubacteria و Clostridia التي تحوي على الإنزيمات التي تحول المواد السابقة للمسرطنات Procarcinogens الى مواد مسرطنة مثل إنزيمات β -glucuronidase و Nitroreductase و Azoreductase

وتقوم بكتريا حامض اللاكتيك بكبح هذه الانزيمات كما يتضح من حصول انخفاض في هذه الانزيمات في غائط وإدرار الأشخاص اللذين يتناولون منتجات الألبان المخمرة . وقد وجد ان الاشخاص المعرضين لسرطان القولون تحوي المناطق السفلى منه على عدد قليل من العصيات اللبنية . وفي نماذج الدراسات البشرية والحيوانية وجد ان اعطاء بكتريا *Lb. acidophilus* تؤدي الى اختزال عملية التطفير لمطفرات موثقة او مواد قابلة للتحول الى مطفرات Promutagens وكذلك عند تناول اللحوم المقلية سواء باستعمال الأنظمة الميكروبية مثل نظام أيمس او باستعمال انظمة اللبائن .

2- الآلية الثانية التي تعمل بها الاحياء العلاجية وبكتريا حامض اللاكتيك هو الامتزاز، فقد وجد ان العديد من البكتريا المعزولة من اغذية مخمرة لها القابلية على الارتباط بالمتحللات الحرارية Pyrolyzates للحوامض الامينية مثل :

Glu-p-1 متحلل ينتج من حامض الكلوتاميك وتركيبه

2-amino-6-methyldipyrido[1,2-a:3',2'-d] imidazole

Phe-p-1ينتج من تحلل الحامض الاميني Phenylalaninie

Trp-p-1 ينتج من تحلل الحامض الاميني Tryptophan وتركيبه

3-amino-1,4-dimethyl-[^{3}H] pyrido [4,3-b] indole

Try-p-2 وينتج ايضا من تحلل الحامض الاميني التربتوفان وتركيبه

3-amino-1-methyl- [^{5}H] pyrido [4,3-b] indole

ومركبات الكينولين التي تنتج من قلي الأسماك واللحوم

MeIQ1 وتركيبه

2-amino-3,4-dimethylimidazo(4,5-f) quinoline

- IQ

2-amino-3-methylimidazo(4,5-f) quinoline

IQx

2-amino-3,8- dimethylimidazo(4,5-f) quinoline

وهذه المطفرات تنتج من طبخ الاغذية الغنية بالبروتينات ، فالبكتريا المعزولة من الانسان لها قابلية قوية للارتباط الكامل بـTrp-p-2 بشكل غير قابل للرجوع ، اما عزلات الالبان المتخمرة فوجد انها ترتبط للمطفر بنسب تصل الى حوالي 80 % ولكن بشكل قابل للرجوع . اما Phe-p-1 وهو مسرطن يكثر في الاغذية الغربية فكانت العزلات البشرية قادرة على ربط 50 % منه . وتمتلك البكتريا *Le .mesenteroides* ssp *mesenteroides* وكذلك *Bif. longum* لها القابلية على ربط المطفرات للبيبتدوكلايكان اضافة الى العصيات اللبنية التي تمتلك القدر الأكبر على ذلك . وكذلك البكتريا *Ent. faecalis* تعمل كـ Desmutagen بواسطة جدارها الخلوية للعديد من المطفرات .

وقد وجد ان عملية الارتباط هي عملية فيزيائية بحتة ويكون الارتباط سطحي أي الى البيبتيدوكلايكان ، كما ان عملية الارتباط لا تتاثر بالرقم الهيدروجيني (2.5- 8.5) والأفضل هو المدى 6 - 7 ، والحرارة (4-37 ْم) . ومثل هذه التجارب تجرى عادة باستعمال سلالات أيمس TA98, TA100 وغيرها واستعمال سيطرات موجبة من مواد مطفرة موثقة مثل NTG (Nitrosoguanidine) , و N-nitrosodiethyl amine .

ويحتل اللبن العادي المخمر ببكتريا *Lb. bulgaricus , S. thermophilus* والتي هي من الاحياء الصناعية وليست العلاجية مكانة جيدة في مضاد ته للمطفرات فهو يمكن ان يعاكس التأثير المطفر للـ NTG وغيره من المطفرات وربما كان ذلك نتيجة لبعض المواد التي تنتج اثناء التخمر مثل البيبتيدات ، كما ان هناك حقيقة أشارت لها الدراسات وهي ان المطفرات يمكن ان ترتبط الى البيبتيدوكلايكان للخلايا المقتولة بالحرارة بشكل كبير وتزداد فاعلية الارتباط في الخلايا المقتولة بالحامض الذي يفسر على انه يكشف ويفسح المجال لمواقع اكثر لارتباط المطفرات . كما ان كازينات الحليب لها القابلية للارتباط بالأمينات متباينة الحلقات .

واضافة الى بكتريا اللبن فان العديد من سلالات جنس العصيات والمكورات اللبنية والمكورات المسبحية والبكتريا المنشطرة لها فعاليات مضادة للتطفير باستعمال نظام أيمس. كما ان كازينات الحليب والكالسيوم تقلل من الفعالية التطفيرية بنمط معتمد على الجرعة ، وكل منها منفردا يعطى فعالية مثبطة اقل من استعمال الحليب المخمر ككل . كما ان البكتريا المنشطرة تحتاج الى تراكيز عالية من الخلايا 10^{12} وحدة تكوين المستعمرات / لتر لإظهار الفعالية . ومما ذكر اعلاه وضمن آلية الامتزاز يعتقد ان الاحياء العلاجية وكذلك الألبان المخمرة بأحياء صناعية يكون لها تاثير مزيل للتطفير Desmutagen . والمواد المزيلة للمطفرات هي مركبات تعطل المطفرات مباشرة مثل بعض الفيتامينات والكلوروفيل وأملاحه ، وتأثيرها يكون باليات لا تشمل عمليات إصلاح DNA ، ويكون ذلك بحث إنزيمات لغلق تنشيط المطفر ، او اكتساح المطفر كما في تحويل

Nitrosoamines الى نتريت Nitrite في المعدة . ومن مزيلات التطفير فيتامين C ومركب Glucoinolates من العائلة الصليبية مثل نبات الجرجير *Eruca sativa* الذي له قابلية عالية كمزيل للمطفرات ومثبط للتطفير Bioantimutagen .

3- الآلية الاخرى هو احتمال ان البكتريا العلاجية تفرز مواد تقوم بتثبيط المسرطنات والمطفرات . ففي دراسات أجريت حول الفعالية المضادة للتطفير استعمل المطفر DMBA (3,2-dimethyl-4-amino biphenyl) و NTG وجد ان استخلاص الحليب المخمر بانواع مختلفة من بكتريا حامض اللاكتيك مثل *Lb. delbrueckii* ssp *bulgaricus* و *Lb. helveticus, Lb. acidophilus* و *S. salivarius ssp thermophilus* بالأسيتون ، واستعماله فكان للمستخلص فعالية مضادة للتطفير باستعمال السلالة TA100 ووصلت قابلية اختزال التطفير 30 - 95 % وبشكل يعتمد على الجرعة مقارنة باستخلاص الحليب غير المتخمر الذي كانت قابليته تتراوح بين 10-36% .

وعملية التطفير بالـ NTG تكون مباشرة ولا تحتاج الى تنشيط ايضي وتشمل تحولا لا إنزيميا بالكلوتاثايون الى Methyldiazonium cation الذي يكون تلقائيا جذر المثيل CH_3^+ ذات القوة العالية للمثيلة (Methylation) ويهاجم O^6 (ذرة أوكسجين السادسة) في القاعدة النتروجين الكوانين مؤديا الى تحول زوج القواعد النتروجينية GC الى AT وعليه فأن المواد المستخلصة من الحليب المخمر ربما تعمل بأحد الآليات آلاتية :

- تتفاعل مباشرة مع NTG وتعطله .
- تتفاعل مع الكلوتاثايون وتمنعه من تنشيط NTG .
- تقوم بمعادلة Methyldiazonium cation أو جذر المثيل CH_3^+ .
- تساعد في تصليح الضرر الناتج في DNA وتشجع إزالة O^6-methylguanine وربما توجد آليات أخرى .

اما DMAB فهو مطفر غير مباشر يحتاج الى تنشيط ايضي بواسطة " Cyt P_{450} 1A2 " ليكون N-hydroxy DMAB والذي يمكن ان يحول بعملية الاستلة Acetylation الى مركب يؤدي الى تكوين التشوهات (Adducts) في DNA وتكوين N-deoxyguanosin -8-yl- DMAB, deoxyguanosin-N^2-yl-DMAB, - 5 التي تؤدي الى اضطراب القواعد النتروجينية وتحول GC الى AT ولذلك يحتمل ان يكون تأثير المواد المستخلصة بأحد الآليات الآتية :

- التفاعل المباشر مع DMAB .
- تثبيط فعالية Cyt.P_{450}.

- تثبيط خطوات التحول بالانزيمات مثل تثبيط الانزيم Acetylase .
- التفاعل مع N-hydroxy DMAB او الأشكال الأخرى المنشطة للمركب .
- تشجيع عمليات إصلاح DNA .

ويلاحظ ان مركب واحد لا يمكن ان يقوم بتثبيط NTG وDMAB وذلك لاختلاف مساراتهم في التأثير . ووجد ان المواد المضادة للـ DMAB هي مواد ذات طبيعة كارهة للماء ومتعادلة ولا تذوب في الماء وكان أفضل استخلاص لها عند رقم هيدروجيني 6 ــ 7 والتي يستخلص معها مركب غير مشحون تكون فيه مجموعة واحدة من الأمين NH2 ومجموعة واحدة من الكاربوكسيل (COO^-).

اما في الأرقام الهيدروجينية الأخرى فقد استخلصت بعض المواد عند رقم هيدروجيني 3 و 13 وقد تكون مثل هذه المواد السالفة موجودة في الحليب بشكل غير فعال ولكنها تفعل عند تخمير الحليب .

اضافة الى ما ذكر اعلاه فأن استخلاص الحليب المخمر بمواد اخرى غير الأسيتون مثل خلات الاثيل Ethyl acetate تؤدي الى الحصول على مواد مثبطة للقابلية التطفيرية للمطفر Trp-p-2و 4NQO(4-nitroquinolin-N-oxide) باستعمال سلالات أيمس TA98 و TA100 و هي ليست المواد المسئولة عن تثبيط التطفير بالـ NTG و DMAB المذكورة اعلاه .

والمطفرات Trp-p-2و 4NQO يشتركان في الخطوات الاولى من التفاعلات أذ يتم اضافة الهيدروكسيل $Cyt\text{-}P_{450}$ 1A2 تليها عملية استلة وخطوات انزيمية اخرى تؤدي الى التحوير بواسطة سلالات أيمس . من هذه الدراسات استنتج ان البكتريا *Lb. delbrueckii* ssp *bulgaricus* احدى بوادئ اللبن التقليدي تنتج عددا من المواد المضادة للتطفير التي تكون ذات طبيعة كارهة للماء ، وبشكل لا يعتمد على تغير الرقم الهيدروجيني اثناء التخمر .

علاقة الاحياء العلاجية بالسموم الفطرية

المواد التي تدخل الجسم عن طريق الفم تتعرض مباشرة لتأثير فلورا الامعاء ومنها سموم الافلا Aflatoxins وهي مواد ايض ثانوية تنتج من مجموعة من الفطريات منها *Asperigllus flavus* و *Asp. paraciticus* و *Asp. nomius* وغيرها التي تنمو على الاغذية والأعلاف عند أي مرحلة سواء في الحقل ، او اثناء الحصاد او الخزن او النقل ، ويؤدي وجود السموم الى خسائر اقتصادية على الصناعات المعتمدة على المحاصيل او منتجات الالبان من حليب الحيوانات التي تتناول الأعلاف الملوثة وتؤثر على نمو وكفاءة الحيوانات .

وسموم الافلا تسبب مشاكل صحية فهي تسبب السرطانات للانسان والحيوان كما انها تولد التشوهات او المسخ Teratogenic وتعد من المواد المحبطة للمناعة .

واهم هذه السموم هو B1 ثم B2 والتي عند استهلاكها تتعرض لعمليات ايض وتحول الى M1, M2 وتفرز في أنسجة وسوائل الجسم الحيوية منها الحليب للحيوانات الحلوبة وحليب الأم . والسم AB1 من ملوثات الاغذية الذي لا يمكن تجنبه ويعد من المطفرات و المسرطنات القوية للانسان وقد فشلت طرق إزالته من المواد الملوثة لذلك فان التوجهات الحديثة ترمي الى محاولة منع امتصاصه في القناة الهضمية للانسان و الحيوان .

الاحياء العلاجية وسموم الافلا

ان ازالة السم AB1 بواسطة البكتريا من الغذاء او العلف قبل الاستهلاك ربما يوفر الطريقة الأفضل لإزالة التلوث و ان كانت ستضيف خطوة جديدة لعمليات التصنيع . وقد وجد ان العديد من بكتريا حامض اللاكتيك وخاصة العصوية وكذلك انواع من جنس *Propionibacterium* مثل البكتريا *P. freudenrecichii* ssp *shermanii* التي تستعمل في ازالة السم من فروج اللحم والمكورات اللبنية والبكتريا المنشطرة لها القابلية على تقليل السم في الأغذية والمحاليل ، وهذه الصفة قد توجد في اجناس اخرى مثل *E. coli* ولكن بكفاءة اقل ، وعلى العموم فان الملاحظة العامة هو اختلاف النسب اعتمادا على السلالة المستعملة . ومن اهم العصيات اللبنية في هذا المجال هي *Lb. rhamnosus* GG والمسجلة في مركز حفظ السلالات الامريكي بالرقم ATCC 53103 وكذلك السلالة *Lb. acidophilus* LC-705(DSM7061) والسلالة *Lb. casei* Shirota والسلالة GG هي الاكثر كفاءة اذ تبقى محتفظة بـ 70% من السم المرتبط حتى بعد الغسل عدة مرات .

الآليات المستخدمة لإزالة AB1

ان آلية إزالة او تخفيض السم تختلف بين الاحياء المستعملة فالبكتريا *Flavobacterium aurantiacum* تزيل السم بواسطة عمليات ايضية بعد ان تكون معه معقد ليس بالقوي على سطح الخلايا ويكون هذا الارتباط آني وقابل للرجوع كما يظهر في استعمال الخلايا المقتولة اذ ينطلق السم منها عند الغسل بالماء ، اما الخلايا الحية فيصعب استرجاع السم منها سواء بالغسل او المعاملة بالأمواج الصوتية وتكسير الخلايا . اذ ان السم يتفكك بتأثير الإنزيمات الخلوية الداخلية .

اما بكتريا حامض اللاكتيك فهي تربط السم على سطوحها الخارجية بشكل قابل للرجوع ولكن بدرجات مختلفة تعتمد على السلالة و الظروف المطبقة .

والارتباطات قد تساهم فيه تداخلات كهربائية مستقرة وذلك لان استعمال اليوريا التي تؤثر على التداخلات الكارهة للماء كان لها تاثير قليل في اطلاق السم المرتبط وكذلك لا تؤثر التراكيز المتزايدة من كلوريد الصوديوم وكلوريد الكالسيوم .

ومعاملة الخلايا ببعض الانزيمات مثل الانزيمات المحللة للبروتينات والدهون او استعمال الحرارة التي تمسخ البروتينات ومعاملة الخلايا ببعض الانزيمات مثل الانزيمات المحللة للبروتينات والدهون لم تؤثر على قوة الارتباط مما يشير الى ان الجزء الكاربوهيدراتي من الجدران الخلوية وبشكل خاص البيبتيدوكلايكان هو المسئول عن الارتباط . اضافة الى ذلك فان استعمال الخلايا المقتولة بالحرارة لا يؤثر على قابلة الارتباط اما المعاملة بالحامض مثل HCl فهي تزيد من قابلية الارتباط . والحامض له تاثيرات مختلفة على مكونات الجدران الخلوية وفي هذا المجال يكون تاثيره على البيبتيدوكلايكان هو الأهم فهو يؤثر على الارتباطات الكلايكوسيدية مؤديا الى اضطراب تركيب المكوثر ألجداري ولو ان المكوثر الجداري في بكتريا حامض اللاكتيك يكون سميكا لكن تقليل الارتباطات العرضية يمكن ان يؤدي الى زيادة الثقوب ومثل هذا التشويه في الجدران الخلوية ربما سمح للسم بالارتباط اكثر للجدران وكذلك الأغشية الخلوية التي تكون غير متاحة للارتباط عندما تكون الخلايا متماسكة وفي حالتها الطبيعية وارتباط السم بالخلايا غير الحية يؤكد عدم وجود عمليات ايضية تجري على السم . ومن الجدير بالذكر ان الخلايا عند اعطائها عن طريق الفم تمر في المعدة ذات المحيط ألحامضي جدا والذي يؤدي الى قتلها او اضطراب تركيب جدرانها الخلوية والذي يساعد من اقتناص كميات اكبر من السم وبالتالي منع امتصاصه من الامعاء ومعاملة الخلايا بمواد اخرى مثل الكحول الاثيلي او الأشعة فوق البنفسجية او بالأمواج الصوتية او بالقواعد فلا تؤثر بشكل كبير على قوة الارتباط .

ان بعض المطفرات قد ترتبط بآلية تبادل الايونات الموجبة Cation-exchange نظرا لانطلاقها عند رقم هيدروجيني قاعدي ، اما السم فان ارتباطه لا يتأثر بالأرقام الهيدروجينية الممتدة من 2- 10 والتي تمثل التغاير الحاصل في القناة الهضمية وهذا يعني ان تبادل الايونات الموجبة غير مسئول عن عملية الارتباط .

ان الارتباط المقترح لتكوين معقدات من السم والبكتريا هو الارتباط غير التساهمي Non-covalent binding ويكون ضعيفا ولذلك فعند اختيار السلالات لإزالة السم يجب ان يؤخذ بنظر الاعتبار قوة الارتباط ، اذ ان مثل هذه المعقدات يمكن ان تزال بعمليات الغسل المستمر التي تحصل للخلايا البكترية في الامعاء أثناء حركتها مما يؤدي الى نتيجة عكسية وهي انطلاق السم ثانية . ومن جهة اخرى فان البكتريا العلاجية عند ارتباطها بالمواد تقل قابليتها للارتباط بالخلايا الحيوانية أي ان ارتباط الخلايا مثل GG بالسم يغير من قابليتها على الالتصاق للخلايا

الحيوانية Caco2 وربما وفرت هذه الحالة جانبا ايجابيا اذ يتم التخلص من الخلايا والسم المرتبط بها الى خارج الجسم عن طريق الغائط .

من الإثباتات الاخرى حول الارتباط السم الى السطوح الخارجية هو استعمال الأجسام المضادة للسم Anti-AB1 ، وبما ان الخلايا لا تستطيع نقل الجزيئات الأكبر من55 كيلو دالتون وقد وجد ان السم يرتبط الى الجدران الخارجية بطريقة يمكن ان يميز من قبل الأجسام المضادة التي ترتبط إليه على السطح لان نتائج دراسات الاليزا ELISA أشارت الى ارتباط الأجسام المضادة للسم وبذلك لابد ان يكون الارتباط على السطوح الخارجية لعدم إمكانية عبور المعقدات الى داخل الخلية .

العوامل المؤثرة على ارتباط الخلايا البكترية بسم الافلا

هناك بعض العوامل التي تؤثر على ارتباط السم الى الخلايا ومنها :

1- عمر الخلايا وقد وجد ان ارتباط خلايا سلالات GG و LC - 705 للسم يكون على اشده في المدة الواقعة بين نهاية الطور اللوغارتمي وبداية طور الثبات ثم تنخفض بعد ذلك والخلايا تكون محاطة بكبسولة من السكريات المعقدة اثناء نموها وتكون ذات طبيعة محبة للماء ولذلك وجب دراسة طبيعة تغير شحنات سطح الخلايا اثنا أطوار النمو المختلفة واعتماد الخلايا في الطور الملائم لمعالجة النماذج الملوثة وذلك لان جريئة AB1 كارهة للماء وهذه الكراهية هي التي تؤدي الى فك ارتباطه وذوبانه في الكلوروفورم الذي يتلاءم مع هذا المذيب الذي يمكن ان يطلق 80- 99 % من السم المرتبط . مما يشير الى احتمال شمول التداخلات الكارهة للماء في آلية ارتباط السم للخلايا .

2- حرارة الحضن وهنا وجد ان حرارة الحضن لا تؤثر على ثباتية المعقد المكون من السم والبكتريا بمدى 4 - 37ْم وقد تفيد هذه النقطة في حماية الاغذية المحفوظة بالتبريد .

3- الرقم الهيدروجيني وقد ذكر اعلاه ان المعقدات تحتفظ بقوتها على مدى واسع من الأرقام الهيدروجينية

4- سرعة الارتباط وجد ان عملية الارتباط سريعة جدا فكل من GG و LC705 ترتبط باكثر من 80% من السم في اقل من ساعة ، وتحت ظروف الامعاء في فروج اللحم وجد ان المعقد المكون من السم و السلالات المذكورة يبقى ثابتا لمدة ساعة عند قياسه باستعمال طريقة Chicken intestinal loop technique. . وفي هذا المجال من الدراسات وجد ان GG قللت من امتصاص السم بنسبة 74% و LC-705 44% تحت ظروف مماثلة بوقت استغرق حوالي دقيقة اما البكتريا *Pr. freudenrecichii* ssp *shermanii* فقد قللت الامتصاص بنسبة63 % .

5- الظروف المستعملة ، ان العديد من البكتريا العلاجية المستعملة لانتاج الاغذية الخاصة ترتبط بـ AB1 بكفاءة خارج الجسم الحي ولكن داخل الجسم او بالأحرى داخل الامعاء حيث يكثر المخاط

فالاحياء العلاجية مثل GG ، LC-705 و *Bif. bifidum* وغيرها تكون غير قادرة على تحليل البروتينات السكرية للمخاط وهذا يؤدي الى حماية الطبقة المخاطية . وقد وجد ان GG (المرشحة لإزالة السموم الفطرية) لا تتأثر قابليتها للارتباط بال AB1 بوجود المخاط لحد تركيز 8 ملغم / مللتر وترتبط السلالة بقوة لكل من السم و المخاط بينما السلالات الاخرى تقل كفاءتها عند تركيز 1 ملغم مخاط / مللتر، والارتباط يعتمد على عدد البكتريا فعند وجود أعداد قليلة يؤثر المخاط ويمنع ارتباط السم الى LC-705 وسلالات من بكتريا حامض البروبيونيك *Propionibacterium* السلالة JS المستعملة لهذه الأغراض . وهذا يعني ان استعمال خليط من الاحياء يكون اقل كفاءة للارتباط الى السم بوجود المخاط ويكون التاثير اكبر في الامعاء عند وجود عوامل التداخل وهذا ما يضعف التأثير في الحيوانات .

والواضح ان مستلمات المخاط هي ليست مستلمات السم وذلك لان قتل الخلايا بالحرارة يؤدي الى فقدها قابلية الارتباط بالمخاط وليس بالسم بل بالعكس قد تزيد المعاملة من كمية السم المرتبط ، وهذا يفسر ان ارتباط المخاط يكون لمستلمات بروتينية في حين ان الارتباط بالسم يكون بالكاربوهيدرات كما ذكر انفا ، ولكن التداخل بين ارتباط السم والمخاط يمكن ان يفسر على انه حجب تجسيمي Steric hindrance للمستلمات . كما ان السم غير قادر للارتباط بالمادة المخاطية .

ومن التطبيقات العلمية لكفاءة الاحياء العلاجية على التقليل من خطر سموم افلا وخاصة AB1هو استعمال المستحضر التجاري Bioprofit الذي هو احد المواد الحافظة الحيوية Biopreservative وهو مكون من خليط من البكتريا LC-705 و GG و *Pr. freudenreichii* ssp *shermanii* JS . يستعمل المستحضر في علف الدواجن وله قابلية متوسطة على الارتباط بسموم الافلا مقارنة باستعمال الخلايا بشكل منفرد ، واستعمل للانسان ايضا.

الاحياء العلاجية والسرطان

من المعلوم ان 90 % من السرطانات في الإنسان تسببها البيئة وان 70 % سببها الأغذية ولذلك فان بالإمكان تجنبها ، وعليه ظهرت فروق في مدى خطورة بعض انواع السرطان بين البلدان المختلفة . وتأتي الأغذية بالدرجة الرئيسة في الأهمية فمثلا الأغذية قليلة الألبان والغنية بالدهون والبروتينات الحيوانية هي من اهم أسباب توليد سرطان القولون . وعوامل الخطورة لنشوء السرطانات يمكن ان تكون :

- وراثية وتشمل وراثة السلائل العائلية Familial polyposis ، وسرطان القولون بدون سليلة .

● بيئية مثل العيش في مناطق صناعية وعدم النشاط الجسمي ، والتعرض لمواد كيماوية معينة واستهلاك غذاء عالي الدهن منخفض الألياف .

والمواد المسرطنة (في حالة الاغذية) يعتقد انها تنشا من نشاط الفعاليات الإنزيمية للبكتريا الموجودة في القناة الهضمية على المواد والمواد السابقة للمسرطنات (كما سيأتي ذكره لاحقا). وقد انصب الاهتمام حول العناية بالغذاء لتقليل خطر الاصابة بالسرطان وذلك بتغيير النمط الغذائي خاصة بزيادة مساعدات العلاج مثل الالبان واستهلاك الاحياء العلاجية. وتشير الدراسات الوبائية الى ارتباط عكسي بين استهلاك الحليب المخمر وحدوث أنواع معينة من السرطانات ، فمثلا استهلاك اللبن (الحليب المخمر) يضفي حماية ضد سرطان القولون بشكل غير معتمد على تأثير الكالسيوم الواقي . وفلورا الامعاء التي يصل تعدادها الى اكثر من 10^{11} من البكتريا الحية \غرام من محتوى القولون ومنها بكتريا حامض اللاكتيك وكذلك البكتريا المنشطرة مثل *Bif. longum* و *Bif. infantis* لها تاثير في منع الأورام المزروعة او المستحثة بالمواد الكيماوية في الحيوانات وهناك دراسات موسعة تشير الى ان استهلاك اللبن وحليب الخض Buttermilk وجبن الكودا Gouda cheese تمنع حدوث سرطان الثدي عند استهلاكها بكميات كبيرة وتلعب دورا هاما في منع التسرطن في القولون والثدي وذلك باليات يمكن ذكرها بشكل مختصر بالاتي :

1- تثبيط البكتريا المولدة للسرطان Carcinogenic bacteria .

2- تقليل امتصاص المطفرات والمسرطنات في الامعاء .

3- منع تحول المواد المسرطنة الأولية Procarcinogens الى مواد مسرطنة فعالة Active carcinogens .

4- تاثير المواد الايضية الناتجة من الاحياء العلاجية .

5- تقوية الجهاز المناعي وتحوير مكوناته .

6- الارتباط بالمطفرات والمسرطنات ومنعها من إحداث الضرر وربما بازالتها من الامعاء .

7- تخفيض الرقم الهيدروجيني للأمعاء مما يؤدي الى إحباط البكتريا المولدة للسرطانات .

8- افراز بعض السكريات المكوثرة المضادة للسرطان كما هو الحال مع بعض سلالات *Lactobacillus* .

وأشارت العديد من الدراسات التي أجريت في الحيوانات الى ان الاحياء العلاجية يمكن ان تمنع حدوث السرطان ونموه وانبثاث الأورام المزروعة او المستحثة بالمواد الكيماوية كما في زراعة الخلايا السرطانية Ehrlich ascites tumor cells في الفئران السويسرية التي أطعمت اللبن التقليدي لمدة سبعة ايام مما أدى الى تثبيط تكاثر الخلايا السرطانية المزروعة .

الدراسات البشرية

بالرغم من ان الدراسات البشرية قليلة لعدة اعتبارات ولكنها تكون مهمة وذلك :

1- انها تمثل المجموعة المستهدفة في معظم الدراسات لمنع السرطانات وعليه فان النتائج يمكن ان تجد لها تطبيقات مباشرة .

2- تلعب التغايرات بين المجاميع البشرية تلعب دورا مهما في تحديد الاستنتاجات مقارنة بالدراسات الحيوانية التي تجرى على الحيوانات التي تنتخب لتكون مجموعة متجانسة .

وتوجد العديد من الدراسات التي تشير الى فاعلية بكتريا حامض اللاكتيك في منع حدوث السرطانات في الانسان ، فقد وجد ان استعمال سلالات معينة من البكتريا لمدة ثلاث أشهر قلل من انقسام خلايا سرطان القولون ، اضافة الى إمكانية استعمالها مع العلاجات التقليدية للسرطانات فقد ادت الى اطالة عمر المصابين اللذين يعالجون بالاشعاع . والقابلية المضادة للسرطانات لا تقتصر على جنس معين فالبكتريا *Lb. bulgaricus* الصناعية المستعملة في تحضير اللبن التقليدي لها تاثير مضاد لابيضاض الدم Antileukemic effect في الفئران ، وكذلك البكتريا *Bif. longum* تؤدي الى منع الاورام المستحثة بالـ IQ (احد المسرطنات الناتجة من الطبخ) في مناطق مختلفة من الجسم مثل القولون والغدد اللبنية والكبد ، وبصورة عامة فان للبكتريا تاثير يمنع السرطانات المستحثة سواء في تطور الافات السابقة للورم Pre-neoplastic lesions او تطور الاورام فيما بعد .

سرطان القولون :

يعد من اهم السرطانات ذات العلاقة بالأغذية فهو يرتبط ارتباط وثيق بالاستهلاك الكبير للحوم والمواد البروتينية نتيجة لتكون الأمينات متباينة الحلقات أثناء الطبخ ، ويأتي بالدرجة الثانية او الثالثة من حيث تكرار الحدوث في البلدان الغربية الصناعية والدول المتقدمة .

وللأسباب اعلاه كانت لبكتريا حامض اللاكتيك علاقة وثيقة مع سرطان القولون ويحدث سرطان القولون على عدة مراحل وهي :

1- البدء Initiation step : وفيها يقوم المسرطن باحداث تغييرات في DNA وقد يسبق هذه الخطوة تنشيط لطلائع المسرطن ليتحول الى مسرطن فعال . وتوجد عوامل كثيرة تؤثر في عملية البدء والخطوات التي بعدها والتي يمكن ان تكون مفصولة بمدة زمنية عن مرحلة تطور الورم وهنا يصعب تحديد المرحلة التي يمكن إجراء المعالجة مثل اعطاء الاحياء العلاجية .

ان الطفرات التي تؤدي الى توليد سرطان القولون يمكن ان تكون في عدد من جينات الورم الاولية Proto-oncogenes او الجينات الكابحة للورم Tumor- suppressor genes ولكن من الواضح انه يجب حدوث عددا معينا من الطفرات قبل حدوث السرطان وتوليد الاورام ، وقد وجد ان

اعطاء سلالة GG تثبط مرحلة بدء سرطان القولون ، والسرطان يمكن ان يمنع بمنع او إعاقة هذه الطفرات بواسطة الاحياء العلاجية .

2- خطوة بعد البدء Post - initiation step : وتكون ناتجة من حدوث عدد من الطفرات التي تؤدي الى تغيير مسارات نقل الإشارات في الخلية Transduction pathways ، وفي هذا المجال وجد ان تناول اللبن او البكتريا *Lb. casei* او استعمال سلالات اخرى من جنس العصيات او البكتريا المنشطرة او مكونات الخلايا او مواد ايضها يمكن ان يقلل من تدمير DNA في خلايا القولون أي لها تاثير مضاد للتسمم الجيني Antigenotoxicity .

3- نمو الأورام الخفية Colonic crypts : وتلي المرحلة السابقة وتتحول مناطق الاصابة الخفية الى اورام يمكن رؤيتها Aberrant crypts (AC) وتعد التراكيب السابقة للأورام Preneoplasmic structures والتي تكبر وتنمو الى الاورام الطبيعية التي يكون نموها متزايدا ، و AC يمكن ان تحدث بشكل منفرد او على شكل تجمعات وتتطور الى سليلة Polyp وبالتالي الى ورم .

وتثبيط الاحياء العلاجية تطور AC او حصول الإصابات السابقة للسرطان ثم الاورام ، وقد يكون التاثير قليلا او غير متناسقا الا انه يبدو معتمدا على الجرعة . فإطعام الفئران بالـ NTG او -1,2 dimethylhydrazine (DMH) يؤدي الى توليد ضرر في DNA لخلايا القناة الهضمية في أثناء 1- 24 ساعة ، ولكن اعطاء اللبن او خلايا من *Lb. casei* باعداد 10^9 بكتريا / مللتر يؤدي الى منع الأضرار في DNA وافضل الاستجابات عند اعطاء اللبن قبل ثمان ساعات من اعطاء المواد المسرطنة . ومنع الضرر الناتج من DMH , NTG في خلايا القولون يمكن ان يحدث بإعطاء البكتريات *S. thermophilus, Lb. confusus, Lb. acidophilus , Lb. gasserii , Bif. longum , Bif. breve* كل على حدة لمدة اربعة ايام قبل التعرض للمطفر . كما ان AC المستحثة بمركب Azoyxmethane قد قلت الى النصف عند استعمال البكتريا المنشطرة مع اللاكتوفيرين وكذلك عند اعطاء المسرطن مع *Bif. pseudolongum* مع احد انواع Neosugars مثل متعددات الفركتوز FOS .

وقد اجريت دراسات مسحية كبيرة لوحظ منها ان تناول الاحياء العلاجية مثل *Lb. casei* Shirota تؤدي الى زيادة ملحوظة في اعداد وفعالية الخلايا التائية المساعدة Th والخلايا القاتلة الطبيعية في المرضى اللذين عندهم سرطان في منطقة القولون والمستقيم Colorectal cancer مما يشير الى ان السلالة Shirota لها دور مهم في إحباط تطور الاورام .

سرطان المثانة:

الدراسات في هذا المجال قليلة ولكن ما اجري منها اثبت ان استعمال الاحياء العلاجية يمكن ان يمنع سرطان المثانة في الانسان .فعند استعمال Yauklt وهو مستحضر يحوي على *Lb. casei* Shirota والذي يستعمله ما يقرب من ثلاثين مليون شخص يوميا خاصة في اليابان ، يؤثر على عودة الاصابة بسرطان المثانة Superficial bladder cancer وكان ذلك باعطاء الاحياء العلاجية بعد اسبوعين من ازالة اورام المثانة وبعد سنة كان حوالي نصف المرضى يعانون من عودة الاورام مقارنة باكثر من 80 % من مجموعة السيطرة .

آليات منع السرطانات :

من المتوقع وجود اكثر من آلية لمنع السرطانات المختلفة وهذه الآليات تعتمد على السلالة المستعملة وكذلك على موقع الورم ومدى تطوره ، ويمكن إيضاح بعض الآليات بالاتي :

1- تغيير فلورا الامعاء : ان استعمار الامعاء من قبل العصيات اللبنية والبكتريا المنشطرة يؤدي الى فوائد صحية للمضيف ، ولذلك فان تغير نمط الغذاء يؤدي الى تحوير فلورا الامعاء والذي بدوره يؤثر على الانزيمات والمسرطنات في اماكن مختلفة من الجسم .

2- التاثير على الانزيمات : وقد يكون ذلك بزيادة فعالية بعض الانزيمات واحباط اخرى .

ففي الجانب الاول فالمعروف ان الغذاء مهم في فعاليات الانزيمات لإزالة السمية من القناة الهضمية وخاصة القولون ، فالنشا غير الذائب يمكن ان يحث الانزيم الواقي Glutathione transferase π في القولون وهذا الانزيم يمكن ان يستحث بنواتج التخمر وخاصة الحوامض الدهنية قصيرة السلسلة (SCFA) . ويستحث ايضا ببعض مساعدات العلاج الحيوي مثل Lactulose الذي يشجع نمو *Bif. longum* ، وتزيد بكتريات اخرى من فعالية الانزيم الذي يعد من الانزيمات المهمة المزيلة للسمية Detoxifying ، والانزيم يعد الاكثر وفرة في خلايا القولون ويساهم في ازالة كل من المنتجات المحبة للالكترونات والمواد ذات العلاقة بتوليد الاجهاد التأكسدي .، كما ان البكتريا المنشطرة والعصيات اللبنية لها فعاليات انزيمية لتفكيك المواد الدخيلة Xenobiotics والمؤذية للأنظمة الحيوية .

واطعام سلالات معينة من بكتريا حامض اللاكتيك يؤدي الى زيادة فعالية الانزيم Cyt. P_{450} reductase (Colonic NADPH- ferrihemo protein reductase) .

ومن الجانب الثاني فالمعروف ان الامعاء تحوي الاحياء الضارة والنافعة ، فالضارة يمكن ان تؤدي الى انتاج مواد سامة بتاثير الانزيمات-Nitroreductase, Azoreductase, β glucouridinase , α- dehydroxylase وغيرها .

فبكتريا Bacteriodes, Clostridia وبكتريا معوية اخرى تنتج انزيم β-glucuronidase بكميات كبيرة ويقوم بتحليل Glucuronides ويلاحظ ان الانزيم يكثر في غائط الأشخاص من أكلة اللحوم والبروتينات والدهون ويقل عندهم Glucosidase في حين يحصل العكس عند النباتين . وأطعام الانسان والحيوان ببكتريا حامض اللاكتيك وخاصة *Lb. acidophilus* من أصل بشري يؤدي الى انخفاض الانزيم .

كما ان تناول البكتريا العلاجية يؤدي الى انخفاض كل من Nitroreductase , Azoreductase التي يعتقد بان لها علاقة بتوليد السرطانات خاصة في الجهاز الهضمي وذلك بتحويلها المواد الأولية المسرطنة الى Proximate carcinogens ، ولذلك فان اعطاء *Lb. acidophilus* مع طلائع المواد المسرطنة يؤدي الى انخفاض مستوى الأمينات المسرطنة . اما عند إعطاء GG لكبار السن ونساء حوامل سليمات واطفال في دراسة موسعة لوحظ ان غائطهم يحوي كميات قليلة من β-glucuronidase وAzoreductase و Urease و Glycocholic acid hydrolase وهذا يشير الى ان العصيات اللبنية تحبط الفعاليات الايضية لفلورا القولون وبالتالي تقلل من انتاج المواد المسرطنة . ومن الأمثلة الأخرى فان استعمال DMH الذي هو مسرطن غير مباشر ويتحول الى مادة مسرطنة بتاثير الانزيم β -glucuronidase البكتيري في الامعاء الغليظة مع *Lb. acidophilus* يؤدي الى تأخير حدوث السرطان .

ومن الانزيمات المهمة في هذا المجال هو Nitroreductase يوجد في الامعاء ويحول النترات NO_3^- الى نتريت NO_2^- والذي يمكن ان يؤدي في مراحل أخرى الى انتاج النتروجين والامونيا . ولكن النتريت يعد مركبا وسطيا لإنتاج مركبات N -nitroso المعروفة بانها ذات فعالية عالية لتوليد السرطانات ، وبكتريا حامض اللاكتيك تحوي على الانزيم Nitrite reductase لذلك فهي تقلل من تركيز النتريت بقبطه وبذلك تقل مواد الاساس لانتاج المواد المسرطنة Nitrosoamines .

وتساهم معظم البكتريا العلاجية في التأثير على الانزيمات الضارة ويساعد في ذلك اعطائها مع مساعدات العلاج الحيوية مثل Lactulose الذي يساعد في نمو الاحياء العلاجية مثل البكتريا المنشطرة او سلالات من جنس العصيات وكذلك المكورات مثل *Lc. lactis* ssp *lactis* , *Lc. lactis* ssp *cremoris* .

3- تأثير مواد الايض المنتجة من الاحياء العلاجية : وتشارك مواد الايض في منع تدمير DNA فبكتريا حامض اللاكتيك لها القابلية على تعطيل المواد المسممة للجينات والمسببة للسرطانات خارج الجسم الحي عند استعمال خطوط خاصة من الخلايا السرطانية مثل

Sarcoma -180 ، Ehrlich ascites tumor cells ، كما ان اللبن العادي يحوي على مواد مضادة للسرطان يمكن فصلها بطريقة التبادل ألايوني من نواضح اللبن Yogurt dialyzate .

ولعل اهم مواد الايض المشاركة في منع عمليات التسرطن هي الحوامض الدهنية قصيرة السلسلة SCFA ومنها البيوترات Butyrate التي لها علاقة وثيقة بالعديد الفعاليات الحيوية في منطقة القولون . ومن هذه الفعاليات :

1- تؤثر على درجة مثيلة DNA (DNA methylation) والتي تؤثر في التعبير عن الجينات وان كانت تاثيراتها عن توليد سرطان القولون غير معروفة بشكل واضح .

2- تساعد في زيادة تكاثر الخلايا الطبيعية وتحبط تكاثر الخلايا المحولة Transformed cells وذلك بتشجيع الاستماتة لها ، واستماتة الخلايا الطبيعية .

3- تعد البيوترات وقود حيوي لخلايا القولون وهذا يتضح من ان الخلايا المعاملة بالبيوترات تزداد مقاومتها للتدمير ألتأكسدي الذي يحصل بواسطة بيروكسيد الهيدروجين مقارنة بالخلايا غير العاملة . تزيد البيوترات من أنزيم Glutathione transferase π في خلايا القولون وربما كانت مسئولة عن زيادة التعبير عن الانزيم في أنسجة القولون ، ولذلك فان حث الانزيم بالبيوتيرات سواء بالفلورا الطبيعية او زيادة فعاليته بمساعدات العلاج ربما كان أكثر الآليات أهمية في الحماية من السرطانات التي تستحث في القولون .

ومما يزيد من قابلية انتاج الحوامض الدهنية قصيرة السلسلة هو استعمال مساعدات العلاج الحيوي وهي مواد غير قابلة للهضم من قبل الانسان ولكنها تستعمل في قبل الاحياء العلاجية التي يمكن ان تزداد بوجودها مؤدية الى عودة التوازن في الامعاء ، كما انها لها صفات مضادة للأورام عند استعمالها لوحدها كما في استعمال FOS (متعددات الفركتوز) . لذلك فان اعطاء الاحياء العلاجية مع مساعدات العلاج ومنها ما ذكر انفا وكذلك نخالة الحنطة Wheat bran والنشأ المقاوم يزيد من تكوين الحوامض الدهنية قصيرة السلسلة مثل البيوترات في حين ان اعطاء البكتين يؤدي الى زيادة الخلات وتقليل الرقم الهيدروجيني في غائط المصابين ، كما ان طبيعة المواد المعطاة تؤثر على نوعية الحوامض الناتجة . ومن الجدير بالذكر ان البكتريا المنشطرة حتى عند إعطائها مع المواد المساعدة في العلاج مثل FOS تؤدي الى تغير نمط الحوامض الدهنية قصيرة السلسلة الا انها لا تنتج البيوترات او البروبيونات Propionate ولكنها تؤثر باليات اخرى مثل تقليلها لفعالية الانزيم Ornithine decarboxylase وكذلك تقليل فعالية ras - p^{21} oncogene activity وبذلك تمنع السرطان بشكل متازر مع مساعدات العلاج الحيوي .

4- ربط المواد المسرطنة : وهي الية الاخرى تعمل بها الاحياء العلاجية اذ ترتبط المواد المسرطنة الى سطوح الخلايا مثل ارتباط الأمينات متباينة الحلقات وسموم الافلا الى الجدران الخلوية (كما مر في مناقشة القابلية المضادة للتطفير) . وقد تعمل الجدران الخلوية المشتقة من الخلايا في هذا المجال والتي تتاثر بعدة عوامل مر ذكرها .

5- التاثيرات غير المباشرة : وسيذكر مثال واحد على ذلك وهو ان الاحياء العلاجية تمتلك العديد من الانزيمات التي تكون فعاليتها في صالح المضيف ومنها الانزيم β-glucosidase الذي يشطر الجزء غير السكري Aglycone من العديد من المواد مثل Isoflavones وهذه الاخيرة تعد من المكونات المسئولة عن الكثير من الفوائد الصحية ، واكثر الاغذية تحوي عليها مثل فول الصويا الحاوية على المركب المرتبط بالسكر ومنها Genistin و Daidzin وكميات اقل من Glycitin فأنزيمات الامعاء تزيل السكر وتبقى هذه المركبات في الامعاء التي يسهل امتصاصها. وهذه المركبات تتايض اكثر لتكوين O-desmethylangolensin (O-dema) و Equol ينتج من Daidzin . و Equol له علاقة بحدوث سرطان الثدي في مراحل قبل وبعد سن اليأس (Premenopause و Postmenopause) أي له علاقة بالنسق الهرموني في النساء قبل سن اليأس . وفلورا الامعاء لها علاقة وثيقة بتأيض Daidzin الى ايكول الذي له علاقة بمنع سرطان الثدي ، ولذلك فأن وجوده يعد احد الواسمات التي تشير الى منع حدوث السرطان بواسطة بكتريا الامعاء ، وبما ان الغذاء يؤثر على فلورا الامعاء فانه سيؤثر على كميات الايكول .

وقد وجد ان استهلاك الإنسان للبكتريا *Lb. acidophilus* و *Bif. longum* يزيد من وجود الانزيم β-Glucosidase الذي يساعد في إطلاق الجزء غير السكري من الايزوفلافونات ويزيد من امتصاصه. وعليه فان ارتفاع نسبة الانزيم يعد مهما للصحة وذلك لان الفلافينويدات Flavonoids لها فعالية مضادة للتطفير والأكسدة والمسرطنات إضافة الى إنها من منشطات الجهاز المناعي .

6- التأثير على الجهاز المناعي : وتشارك الاحياء العلاجية في مواجهة السرطان من خلال الجهاز المناعي ، إذ وجد ان هذه الاحياء او ما تنتجه من الببتيدات تمنع تكون وتطور الأورام بالاعتماد على تحوير الجهاز المناعي . وقد مر تفصيل أكثر الجوانب في فصول سابقة .

الفصل السابع

الاحياء العلاجية واعتلالات الجسم

الاحياء العلاجية واعتلالات الجسم

إعتلالات الجهاز الهضمي

إعتلالات الجهاز الهضمي كثيرة ومتعددة الأسباب ولعل الاسهالات تأتي في مقدمة هذه الأمراض. وقد تكون أسباب الإسهال بكتيرية او فيروسية او أسباب غير معروفة ومشكلة الإسهال مشكلة عالمية وتتفاقم في الدول النامية . والإحياء العلاجية لها دورا مهما في علاج إعتلالات الجهاز الهضمي ومجمل عشرات الدراسات التي أجريت منذ عشرات السنين تشير الى ان الاحياء العلاجية يمكن ان تؤدي عدة اغراض منها :

1- تستعمل في علاج الإسهال عند الأطفال الناتجة عن الإصابات الميكروبية .

2- تمنع الإسهال المرافق لاستعمال المضادات الحيوية .

3- تمنع الإصابات المستشفوية Nosocomial والإسهالات المكتسبة من المجتمعات في الأطفال .

4- منع إسهال المسافرين .

5- تستعمل في علاج حالة عدم تحمل اللاكتوز .

وإعراض أخرى ، ومن التطبيقات العامة والفطرية استعمال اللبن في المجتمعات البدائية في علاج الإسهال وهو شائع في مناطق مختلفة من العراق سواء كانت مجتمعات متحضرة او ريفية .

وإعطاء المستحضرات العلاجية قد لا يؤدي الغرض المطلوب وذلك لأنها تبقى في القناة الهضمية بضع ساعات (3- 4) ساعات ثم يعود التعداد الميكروبي في الامعاء المصابة الى نقطة البداية ، لذلك وجب العناية بانتخاب السلالات المؤثرة مثل GG التي تستطيع استعمار الامعاء للرضع والأطفال والبالغين . وقد وجد في العديد من الدراسات ان بكتريا حامض اللاكتيك المعزولة من أطفال رضع وحديثي الولادة لها تأثير قاتل خارج الجسم لأنواع متعددة من بكتريا *Salmonella*و *Shigella* و *E. coli* المقاومة لعدد كبير من المضادات الحيوية قيد الاستعمال كما في الدراسات التي أجريت في مستشفيات الأطفال لمدينة بغداد .

الإسهال Diarrhea

الإسهال حالة ترافق حركة الامعاء وتتصف بزيادة تفريغ مواد الغائط المائي وتوجد العشرات من الأسباب للإسهال منها الإصابة بالأحياء المرضية او سمومها وقد تكون بدون إصابة ميكروبية . وبعض الحالات تكون خطرة تؤدي الى الجفاف والموت .

الآليات المقترحة لمعالجة الإسهال

هناك عدة آليات تعمل بها الاحياء العلاجية مثل بكتريا حامض اللاكتيك لمنع الاسهالات او الشفاء منها :

- ان البكتريا عند تناولها تؤدي الى تغيير النظام البيئي الميكروبي بعد استعمارها للقناة الهضمية للإنسان فمثلا *Lb. acidophilus* و *Bifidobacterium* ssp ذات الأصل البشري تستعمل في علاج الإسهال لأنها يمكن ان تعبر حموضة المعدة وعليه فان الآلية معتمدة على قابلية الالتصاق الى خلايا الامعاء وغلق المستلمات أمام الفيروسات وغيرها من غزو الخلايا . كما إنها تغير الرقم الهيدروجيني بإنتاجها للحوامض ، إذ يعد انخفاض الرقم الهيدروجيني دليل على صحة المضيف ، فهي تنتج حامض اللاكتيك والخليك وغيرها من الحوامض العضوية ، إضافة الى إنتاجها البكتريوسينات التي تقضي على الاحياء او البكتريا المرضية .
- الآلية المتعلقة بالجهاز المناعي ، فهي تشجع الجهاز المناعي نحو النواحي الايجابية التي تؤدي الى التأثيرات السريرية الايجابية التي تم ملاحظتها وهذا الاعتقاد مدعم بظهور sIgA الذي يزداد إنتاجه بعد تناول الاحياء العلاجية ، وكذلك تغيير نسق السايتوكينات مثل تشجيع الخلايا التائية على انتاج IFN-γ الذي يؤدي الى منع إفراز ايون الكلوريد وبذا يساعد في إيقاف الإسهال او تثبيطه. وعليه فان الاستجابة المناعية في القناة الهضمية تحصل لها توازن دقيق بين إطلاق السايتوكينات Proinflammatory مثل IL-1 ، IL-6 ، IL-8، TNF والعوامل المضادة للالتهاب مثل IL-4 ،IL-10، IL-I .

اسهالات حديثي الولادة والأطفال

الإصابات المعوية لحديثي الولادة والأطفال شائعة في الدول النامية بالدرجة الرئيسة فهي تأتي بالدرجة الأولى من مسببات الوفيات . ومن أهمها حصول التنخر في الامعاء Necrotizing enterocolitis (NE) وهذا يعد من اهم الأمراض في الأطفال الخدج Preterm infants المولودين قبل الموعد المحدد ، ويؤدي الى انتفاخ البطن ، والقيء وظهور الدم في الغائط وكسل تليه سلسلة من التفاعلات الالتهابية والصدمة ثم حدوث تنخر للأمعاء . ويحصل التنخر في 10- 25% من الخدج الذين يقل وزنهم عن 1.5 كغم عند الولادة وقد تصل النسبة الى النصف (50 %) في الأطفال الذين تقل أوزانهم عن ذلك وتصل الوفيات الى 20- 30% والذين يستمرون بالحياة يعانون من اعراض أخرى وقد يحدث ذلك من فشل بعض الأجهزة والأعضاء مثل الرئات وغيرها .

وذلك لان الأطفال الخدج والمولودون بعمليات قيصرية Caesarean section عادة يكونون غير مهيئين للحياة الخارجية لذلك يحتاجون الى رعاية مكثفة ، في حين ان المولودين طبيعيا

يكتسبون العصيات اللبنية والبكتريا المنشطرة بالابتلاع عند المرور في منطقة المهبل ، وتزداد الى أعداد كبيرة بعد حوالي 30 يوم في الولادة .

وتعود أسباب التنخر المعوي الى استعمار الامعاء بعدد ان الاحياء المرضية مثل *Salmonella* ، *Klebsiella pneumoniae* ، *Shigella* ، *Campylobacter* ، *Staph. epidermidis* ، *E. coli* ، *Ent. faecalis* ، *Enterobacter cloacae* ، *Cl. perfringes* ، *Pseudomonas* ، *Staph. haemolyticus, Streptococci* والسلالات السالبة لفحص التخثر(*Coagulase -ve*) من *Staph. aureus* . وهذه عزلت من 40 % من الأطفال اللذين يعانون من التنخر المعوي مقارنة بـ 13% من الأطفال الآخرين ولكن عند وجود العصيات اللبنية والبكتريا المنشطرة تقل الإصابات التي تساعدها الرضاعة الطبيعية .

والأطفال حديثي الولادة المصابون بتنخر الامعاء تكون العصيات اللبنية لديهم قليلة جدا وهذا يشير الى العلاقة العكسية بين وجود العصيات اللبنية وحصول التنخر الذي يزداد عند قلة العصيات اللبنية ، ولذلك فان إعطاء العصيات والبكتريا المنشطرة يقلل الإصابة بنسبة 60 % في الدراسات التي أجريت في بعض البلدان النامية في إفريقيا .

وتساعد الاحياء العلاجية وكذلك اللبن العادي في الشفاء من الإسهال عند إعطائها مع المضادات الحيوية المستعملة في هذا المجال ، إذ تقصر مدة الشفاء الى حد كبير .

ومن جهة ثانية وجد ان إعطاء الخدج وحديثي الولادة خلطات صناعية يؤدي الى زيادة حصول حالة تنخر الامعاء بشكل كبير جدا .

الإسهال المرافق لاستعمال المضادات الحيوية

من المعروف ان استعمال المضادات الحيوية لعلاج العديد من الأمراض يؤدي الى اضطرابات معوية ،والإسهال المرافق لاستعمال المضادات الحيوية Antibiotic-associated diarrhea (ADD) يعد من اهم المشاكل السريرية التي تلي استعمال المضادات الحيوية وتكون اعقدها الالتهاب القولون الغشائي الكاذب Pseudomembranous colitis ، ففي هذه الحالة تنشط البكتريا المرضية وتصبح هي السائدة وعندها تحصل حالة عدم توازن وفي 20 % من الحالات او أكثر يكون السبب بكتريا *Cl. difficile* وهي من الممرضات الانتهازية صعبة العلاج ، لذالك تمثل الاحياء العلاجية الحل الأمثل إذ تمنعها من انتاج السموم وعودة الإصابة وتكرارها .

ومن بين السلالات الكفوءة هي GG التي تساعد في التخلص من الالتهاب النكوس Relapsing colitis المسببة عن بكتريا *Cl. difficile* الذي يحدث بعد استعمال المضادات الحيوية عند استعمالها بأعداد كبيرة 10^{10} خلية حية يوميا ويمكن ان يمتد تأثيرها الى شهرين بعد الاستعمال وتؤثر السلالة GG ضد الأغلبية العظمى من سلالات *Cl .difficile*

ويلاحظ ان الأحياء العلاجية يمكن ان تقلل من خطر الاضطرابات الحاصلة بعد العلاج ليس بالمضادات الحيوية وإنما بعد العلاج ألشعاعي ايضا .

وتستعمل في هذا المجال البكتريا *Ent. faecium* لتقليل الإصابات في مرضى السل اللذين يتناولون المضادات الحيوية كعلاج لمدة طويلة ، كما ان إعطاء سلالات من جنس العصيات اللبنية المجفدة يؤدي الى قلة الإسهال مقارنة بالأشخاص اللذين يعالجون بالنيومايسين Neomycin .

وإعطاء البكتريا *Bif . longum* مع المضاد الحيوي الارثرومايسين Erythromycin يؤدي الى تقليل اضطرابات القناة الهضمية مقارنة مع مجموعة السيطرة أي حالة إعطاء المضاد لوحده . وهذا يعني ان تناول الاحياء العلاجية يمكن ان يقلل من تاثير المضادات المرافقة او التي تستحث بالمضادات الحيوية على فلورا الامعاء . والأحياء العلاجية لا تتداخل مع المضادات الحيوية المتناولة فمويا من حيث امتصاصها .

الاسهالات الفيروسية

تسبب بعض الفيروسات الإسهال خاصة عند الأطفال ومنها مجموعة الفيروسات العجلية Rota vir*uses* ويستعمل عدد من الاحياء العلاجية لهذه الحالة مثل السلالة *Lb. casei* Shirota , *Bif . bifidum* والبكتريا المنشطرة الأخرى وكذلك *S. thermophilus* وهذه الاحياء تستطيع منع الإصابة إضافة الى معالجة الإسهال الحادث . وأكثر السلالات المؤثرة في علاج اسهالات فيروس الروتا هي السلالة GG . ويبدو ان تأثير هذه السلالة يعود الى تنشيط الجهاز المناعي بشكل رئيس وذلك لقدرتها العالية على استعمار الامعاء ففي إحدى التجارب على أطفال مصابين بالإسهال الفيروسي المسبب عن الفيروسات العجلية (الروتا) وعند إعطاء السلالة بمعدل 10^9 وحدة تكوين مستعمرات / يوم أدى الى استعمار أمعائهم وكانت الجرعة اقل في الأطفال الأصحاء . واستعمال السلالة يؤدي الى زيادة الأجسام المضادة المتخصصة وغير المتخصصة مثل IgA الخاص بفيروس الروتا وزيادة الخلايا التي تفرز IgG ، IgM، IgA والسلالة أكثر كفاءة في هذا المجال من البكتريا الأخرى مثل *S. thermophilus* او *Lb. delbrueckii ssp bulgaricus* والخلايا الحية أكثر كفاءة من الخلايا المقتولة . والاحياء العرجية المعطاة تؤثر على السايتوكينات ، وبالتالي تضعف تأثير الفيروسات او سمومها على الجهاز العصبي المعوي وتؤدي الى إيقاف الإفرازات في الطبقة الطلائية في الامعاء وبالتالي توقف الإسهال ، إذ تتنافس البكتريا مع السموم وهذا ما يحصل عند إعطاء البكتريا العلاجية بعد حصول الإصابة وبذا تمنع أحفاد الفيروس من إحداث إصابات جديدة بغلقها المستلمات على الخلايا غير المصابة .

ويلاحظ ان الآليات التي تعمل بها GG ربما تختلف مع وقت إعطاء العلاج ، فهي قبل حصول الإصابة قد تفعل فيها قابلية الالتصاق لمنع الفيروسات من غزو الخلايا ولكن أعطائها بعد

حصول الإصابة بالفيروسات قد يكون تأثيرها باليات أخرى ومنها اعطاء ونقل الإشارات الى خلايا المضيف لتقليل بعض الإفرازات وتحريك الامعاء حركة دودية دفاعية تكون قادرة على إزاحة المواد المؤذية . والمخاط في الامعاء يثبط فيروسات الروتا ، فوجود الاحياء العلاجية يؤدي الى زيادة التعبير عن الجينات الخاصة بتخليق أنواع المخاط MUC2 , MUC3 وبذا تبعد الاحياء المرضية من الالتصاق بالخلايا ، كما ان الاحياء العلاجية تؤثر على إطلاق بعض السايتوكينات و البروستاكلاندينات واوكسيد النتريك من الخلايا المعوية بتأثير العوامل الممرضة مثل فيروس الروتا وتؤثر في حركة الامعاء إضافة الى الاحياء المستعملة يمكن ان تفرز بعض المواد المثبطة للفيروسات وهذه قد تم إثباتها خارج الجسم الحي عند استعمال رائق نمو بعض السلالات *Lb.* *fermentum* RC-14 , *Lb. rhamnosus* GR-1 الذي يؤدي الى تثبيط 10^9 من جزيئات الفيروسات الغدية Adenoviruses المكونة من أشرطة مزدوجة من DNA (ds DNA) وأخرى من أشرطة RNA (Negative stranded RNA) وفيروسات Vesicular Stomatitis في أثناء عشر دقائق ولكن هذا قد يكون بتأثير الحوامض الناتجة في وسط النمو ولكن لا يمكن استبعاد وجود مواد أخرى .

ويمكن إعطاء السلالة GG عن طريق الحليب المخمر حتى للأطفال الذين تتراوح أعمارهم من 4 - 45 شهرا على شرط ان لا يكون عندهم حساسية تجاه بروتينات حليب البقر، وفي مثل هذه الدراسات وجد ان GG زاد تعدادها في غائط الأطفال نظر لتمكنها من استعمار الامعاء الذي يمكن ان يحصل حتى تحت الظروف غير الطبيعية مثل حصول التهاب معوي معدي حاد Acute gastroenteritis لذلك فهي مفيدة في حالة الإصابات المعوية التي ترافق زيادة نضوحية الامعاء ، إضافة الى ان السلالة تستعمر أمعاء اغلب الأطفال الرضع الأصحاء .

ومن الاحياء الأخرى العلاجية التي استعملت في منع الإصابة ومعالجة الاسهالات الفيروسات الروتا هي *السلالة* *Bif. lactis* BB -12 ، *Lb. reuteri* SD 2222 ومن حصيلة الدراسات المصممة بشكل جيد وتطبيق إحصائي جيد وبدون مؤثرات جانبية تم التوصل الى انه يمكن إعطاء البكتريا مع سوائل الإرواء الفموي او تعويض السوائل عن طريق الفم Oral rehydration solutions بمعدل 10^{10} يوميا للأطفال الذين هم في حالة إسهال حاد أو تعطى على شكل كبسولات أو مع الحليب في الحالات غير الحادة .

الاسهالات البكتيرية

هناك عددا كبيرا من البكتريا السالبة لصبغة كرام يمكن ان تسبب الإسهال ومنها *Sal. typhimurium* و *Sal. enteriditis* وانواع من *Shigella* وسلالات من *E. coli* ، وفي هذه الحالات تستعمل بكتريا *Lb. acidophilus* للعلاج . اذ لها تاثير كبير خارج الجسم تجاه

Sal. typhimurium وكان التاثير معتمدا على السلالة ، وقد وجد ان العديد من السلالات المحلية المعزولة في مدينة بغداد من اطفال رضاعة طبيعية لها تاثيرات على البكتريا المسببة للإسهال والمقاومة للعديد من المضادات الحيوية باستعمال طريقة الانتشار في الاكر ، اذ أظهرت السلالات نسبة تثبيط وقتل تراوحت بين 95- 99.9 % عند النمو المشترك في وسط واحد .

أما التاثير داخل الانظمة الحية فقد وجد ان الفئران تصبح مقاومة للإصابات المميتة بالبكتريا *Sal. enteriditis* عند اعطاء البكتريا *Bif. bifidum* و *Lb. acidophilus* ونتائج مماثلة وجدت في نماذج حيوانية اخرى .

وتستعمل السلالة GG ايضا في علاج الإسهال المائي غير معروف الأسباب او المسبب عن *Salmonella* و *Shigella* و *E. coli* ، اما في الدراسات على الإنسان فإعطاء *Lb. acidophilus* في 500 مللتر حليب يحوي على 6 $10x^{9}$ وحدة تكوين مستعمرات / مللتر يؤدي الى خفض الإصابة الى حد كبير.

إسهال المسافرين :

وهو من الاسهالات غير معروفة الأسباب في اغلب الاحيان وتحصل الحالات في حوالي 20 - 50% من المسافرين في جميع أنحاء العالم ، وقد قدر عدد المصابين في منتصف ثمانينات القرن المنصرم ان عدد السائحين اللذين يصابون بالإسهال حوالي ستة ملايين ويرافق الإسهال اعرضا اخرى مثل المغص ألبطني والغثيان والحمى وغيرها . وقد شخصت بعض الحالات وكانت ناتجة عن سلالات منتجة للسموم من بكتريا القولون Enterotoxigenic *E. coli* .

وتستعمل السلالة GG للعلاج التي تفيد في منع الاصابة عند تناولها بشكل مجفد . وتوجد مستحضرات اخرى من الاحياء العلاجية تستعمل لهذا الغرض مكونة من *Lb. acidophilus* و *Lb. delbrueckii* ssp *bulgaricus* و *Bif. bifidum* و S. *thermophilus* بجرع تحوي 10^{9} x3 وحدة تكوين المستعمرات / غم وكانت دون تأثيرات جانبية وذو كفاءة عالية .

الإمساك Constipation

يشكل الإمساك احدى متاعب الجهاز الهضمي خاصة عند كبار السن والذي له علاقة بالفلورا الطبيعية في الامعاء . ووجود العصيات اللبنية في الامعاء يؤدي الى تقليل الغازات وذلك لإمكانيتها في تغير فلورا الامعاء . وتستعمل الاحياء العلاجية مثل البكتريا المنشطرة لمعالجة هذا العرض في كبار السن وكذلك في النساء الحوامل . وتستعمل بكتريا *Lb. acidophilus* في منتجات الحليب المتخمر في علاج حالات ألامساك المزمن وتعطي نتائج جيدة عند استعمالها مع الألياف ومساعدات العلاج الحيوي مثل Lactitol عند إعطائها لمدة أسبوعين في كبار السن .

إعتلالات أخرى

ومن أهمها التهاب الجيوب المعوية Pouchitis والتهاب القولون التقرحي Ulcerative colitis ومرض كرون Crohn's disease واغلبها غير معروفة الاسباب وكذلك امراض الامعاء المتهيجة Irritable bowel diseases التي تؤدي الى عدة اعراض منها الآلام بطنية وانتفاخ وبعضها يكون صعب العلاج ويشكل خطرا على حياة المريض . فالبكتريا في الامعاء يمكن ان تنتج الغازات ولكن توجد اخرى تستهلك الغازات ، وبكتريا حامض اللاكتيك من الاحياء التي تقلل انتاج الغازات في الامعاء .

واستعمال السلالة GG يمكن ان يساعد في علاج هذه الإعراض مثل مرض كرون . وكذلك استعمال *Lb. plantarum* يؤدي الى نتائج مشجعة لدى هؤلاء المرضى . ويستعمل المستحضر التجاري VSL#3 (مستحضر علاجي يحوي على ثمان سلالات من بكتريا حامض اللاكتيك) بمعدل 6 غم / يوم لمدة تسعة أشهر وكانت نتائج الاستعمال ان حصل انتكاس عند المرضى بنسبة 15% مقابل 100% في مجموعة السيطرة التي لا تستعمل المستحضر ، والدراسات التي أجريت على الحيوانات والإنسان أشارت الى دور ايجابي لاستعمال الاحياء العلاجية والتي يتضخم دورها عند إقرانه بمساعدات العلاج الحيوي في المرضى وحتى الأطفال .

وهناك العديد من الدلائل تشير الى تحوير نشاط الجهاز المناعي في الطبقة المخاطية للأمعاء هو المفتاح للقضاء على هذه الامراض التي تستهدف آليات الالتهاب وتؤذي الطبقة المخاطية وتحول إصابات الامعاء الى حالات مزمنة ولدى هؤلاء المرضى يوجد زيادة في IgG المفروز من قبل الطبقة المخاطية ضد البكتريا المتعايشة في الامعاء ، كما ان الخلايا اللمفاوية التائية تكون ذات فعالية عالية ضد مستضدات الفلورا الطبيعية مما يشير الى انعدام آلية التحمل الموضعية . وقد دعمت هذه الدراسات بالإشارة الى ان زراعة البكتريا غير المرضية من فلورا أمعاء الإنسان تؤدي الى تحفيز انتاج السايتوكينات المختلفة الانواع في مزارع خلوية لخلايا مأخوذة من المرضى . ففي حالة مرض كرون فان *E*. coli المتعايشة مع الإنسان تزيد من انتاج IL-8 و TNF-α من قبل الطبقة المخاطية الملتهبة ، اما في حالة وجود بكتريا *Lb. casei* فانها تؤدي الى تخفيض مثل هذا الانطلاق التلقائي للـ TNF-α من الأنسجة الملتهبة وكذلك تحد من الاستجابة الالتهابية التي تسببها *E. coli* .

ان تأثير وجود *Lb. casei* يمتد ليشمل الأنسجة الداخلية (تحت الطبقة المخاطية Mucosa) مؤديا الى تقليل التعبير عن المواد والواسمات المحفزة للمفاويات التائية في جوف الامعاء Lamina propria ، وهذا يوضح ان الإشارات او المؤثرات التي تحصل عند سطح الطبقة المخاطية ممكن ان تغير من تصرفات او الصفات المظهرية للمفاويات في Lamina propria ، ففي الفئران التي

ينقصها ألجين المسئول عن تخليق IL-10 (IL-10 Knockout mouse) والتي تصاب بالتهاب القولون التقرحي بشكل تلقائي وعند إعطائها المستحضر VSL#3 وكذلك عند إعطائها *Lb. plantarum* يؤدي ذلك الى تغييرات نسيجية في مناطق الإصابة كما ان أعطاء هذه الفئران بكتريا حامض اللاكتيك المهندسة لإنتاج IL-10 تؤدي الى منع حدوث التهاب القولون التقرحي .

ولمساعدات العلاج دورا في التاثير على مثل هذه الأمراض ، فهي تزيد من تعداد العصيات اللبنية والبكتريا المنشطرة . فاستعمال الانيولين في الحيوانات حث فيها التهاب القولون التقرحي يؤدي الى منع التهاب الطبقة المخاطية وانخفاض تسجيل الإصابات في القولون .

اصابات الجزء العلوي من الجهاز الهضمي :

ومن اهم اصابات هذا الجزء هو الإصابة بالبكتريا *Helicobacter pylori* ، والتي تسبب التهاب المعدة type B-gastritis وقرحة هضمية Peptic ulcers وتؤدي في نهاية المطاف الى سرطان المعدة . البكتريا سالبة لصبغة كرام حلزونية في الحالات الاعتيادية ولكنها تتحول الى الشكل البيضوي Coccoid تحت الظروف غير الملائمة والمعتقد ان الشكل البيضوي يساعد البكتريا للعيش في البيئات القاسية او غير ملائمة والذي يحصل عند استعمال المضادات الحيوية او غيرها من الظروف وربما ساعدها ذلك على عودة الإصابة ، في حين يعتقد الآخرون ان تحول البكتريا الى الشكل البيضوي هو بداية لسير الخلايا للموت .

وقد طورت البكتريا وسيلة استعمال أنزيم اليوريز Urease لمعادلة حموضة المعدة التي تصيبها بانتاجه الامونيا ويوجد أنزيم اليوريز على سطح البكتريا .

وتبدأ البكتريا الممرضة إصابتها للمعدة بالالتصاق اوالارتباط الى الخلايا وتكون عملية الارتباط او الالتصاق ضرورية لاستعمار المنطقة وربما الدخول الى داخل الخلايا . فالبكتريا عادة تلصق الى الخلايا الطلائية وفي قليل من الأحيان تدخل الى داخل الخلايا . ويعتقد ان عملية الالتصاق الكفوءة لهذه البكتريا ناتجة عن وجود خمس من اللاصقات التي تميز مستلمات معينة على الخلايا التي تستهدفها وتؤدي الى تكوين اصابات في بروزات الزغابات الدقيقة Microvilli- like projections وتكون هذه مرافقة لتغير الهيكل الخلوي وتغير بروتينات فسفرة التايروسين لخلايا المضيف .

ومن عوامل الضراوة Virulence factors الأخرى إفرازها للسم المعروف بـ Cag Aوهو من السموم الخلوية الذي يؤدي الى حدوث فجوات كثيرة في الخلايا الطلائية المختلفة في المزارع خارج الجسم .

وبعض سلالات العصيات اللبنية يمكن ان تساعد في العلاج من هذه البكتريا ، ففي دراسات أجريت على الإنسان وجد ان استعمال *Lb. acidophilus* يؤدي الى التخلص من عودة الإصابة

في 88 % من المرضى مقابل 72 % من مجموعة السيطرة اللذين كانوا يتناولون تشكيلة من عدد من المضادات الحيوية . إما الخلايا الميتة من *Lb. acidophilus* فقد ساعدت في التخلص من الإصابة في 87% . ويمكن للبكتريا العلاجية في هذا المجال ان تعمل بأكثر من آلية منها :

1- المنافسة على مواقع او مستلمات الالتصاق والتي هي عادة الدهون السكرية اذ وجد ان *Lb. acidophilus* السلالات LB1, LA1 المعزولة من الانسان تمنع ارتباط البكتريا (خارج الجسم الحي) الى مزارع الخلايا المعوية للانسان (Enterocytes)

2- تعطيلها لانزيم اليوريز الذي يعد أساسيا لنمو وبقاء *H. pylori* في المعدة بواسطة بعض المواد . اذ وجد ان *Lb. johnsonii* تقلل من تاثير البكتريا في الاشخاص المصابين واشارت الفحوص الى تقليل انزيم اليوريز والتغيرات المرافقة .

3- انتاج مواد قاتلة للبكتريا ، فهناك عدد من العصيات اللبنية تمنع نمو *H. pylori* خارج الجسم الحي وكذلك لها تاثير داخل الجسم الحي ومنها البكتريا *Lb. salivarius*.

وقد لوحظت مثل هذه التاثيرات عند استعمال رائق نمو للعصيات اللبنية ضد *H. pylori* التي تصيب الانسان وكذلك *H. felis* التي تصيب الفئران . واضافة رائق النمو يؤدي الى تحول الخلايا الى الشكل البيضوي الذي يقود الى موت الخلايا البكترية .

كما ان المواد الموجودة تؤدي الى تعطيل انزيم اليوريز خارج الانظمة الحية . وقد وجد ان المواد المثبطة هي ليست حامض اللاكتيك وإنما مواد حساسة للحرارة وتكون فعالة ضد البكتريا داخل وخارج الجسم . وعموم الدراسات تشير الى ان بعض العصيات اللبنية ذات الأصل البشري تظهر فعل تضادي للبكتريا *H. pylori* في داخل وخارج الجسم الحي .

وهناك بكتريا اخرى يمكن ان تعمل بشكل مضاد للـ *H. pylori* منها *Lb. reuteri* وكذلك سلالة GG اذ تقلل من التاثيرات الجانبية عند العلاج بالمضادات الحيوية وخاصة في الاطفال .

الإصابات الجهازية

ان انتقال كميات صغيرة من البكتريا الحية او الميتة او غيرها من الكائنات يكون مهما في زيادة الفعالية المناعية ، ولكن في بعض الاحيان وعند اضطراب الحواجز المخاطية للقناة الهضمية يؤدي الى عبور كميات كبيرة من الاحياء الحية او الميتة خاصة تلك العائدة الى البكتريا السالبة لصبغة كرام والتي يمكن ان تنتشر في الجسم مسببة الانتان Sepsis ، ومثل هذه تحدث عقب العمليات الجراحية وفي حالة التهاب البنكرياس الحاد وتشمع الكبد وعند حصول فشل لبعض اجهزة الجسم . والاحياء العلاجية يمكن ان تمنع التجرثم في حالة التهاب البنكرياس الحاد اذ اثبت ذلك في الاشخاص اللذين يستعملون *Lb. plantarum* .

اما الاشخاص اللذين اعطوا *Lb. plantarum* مع الالياف او البكتريا المقتولة بالحرارة قبل زراعة الكبد فقد وجد ان اللذين اعطوا المضادات الحيوية كإجراء وقائي (مجموعة السيطرة) قد حصلت إصابات في حوالي النصف ، اما اللذين اعطوا البكتريا الحية فقد حصلت الاصابات في حوالي 13% منهم وحصلت الاصابة في 34 % من اللذين اعطوا البكتريا المقتولة بالحرارة .

وفي حالة العمليات الجراحية الاخرى فقد اجريت دراسات استعملت فيها حالة التآزر العلاجي الحيوي Synbiotic أي استعمال مساعدات العلاج الحيوي مثل النشأ المقاوم والبكتين والانيولين والكلوكان β - glucan مع الاحياء العلاجية مثل *Pediococcus pentoseceus* *Le. mesenteroides* , *Lb. plantarum* , *Lb. paracasei* . ومجموعة اخرى اعطيت ألياف غير قابلة للتخمر ، وكانت النتائج الى ان اللذين اعطوا العلاج المتكامل وهو الحالة الاولى (الاحياء العلاجية مع مساعدات العلاج) حدثت الاصابة في 3% فقط اما اللذين لم يعطوا الاحياء العلاجية فقد حصلت الاصابة لاكثر من نصفهم . لذلك فان الإجراءات الوقائية تكون افضل عند استعمال الاحياء العلاجية في وقت مبكر يؤدي الى خفض الاصابات الجهازية المحتملة خاصة بعد العمليات .

إصابات البروسيلا :

الإصابة ببكتريا البروسيلا Brucellosis تنتج من دخول البكتريا *Brucella abortus* وكذلك *Br. melitensis* الى الجسم ، وهي مشكلة عالمية للإمراض المشتركة بين الانسان والحيوان Zoonosis ، الأولى تسبب الإجهاض والعقم في الأبقار ، والبروسيلا تسبب في الانسان التهاب الشغاف Endocarditis والالتهاب العظمي والنقي Osteomylelitis والتهاب المفاصل Arthritis والحمى المتموجة او ما يسمى بحمى مالطة . والمشكلة عند الاصابة ان البكتريا السالبة لصبغة كرام تتطفل داخل الخلايا وهذا يعني الحاجة الى المناعة الخلوية للتخلص منها اذ تتوارى عن مكونات المناعة الخلطية .

تحصل الإصابات عادة عند التعامل مع الحيوانات المصابة ولكنها اكثر انتشارا في فئات المجتمع التي لا تتعامل مع الحيوانات وذلك بتناول منتجات الألبان الملوثة مثل الحليب غير المعقم والاجبان الطرية غير المنضجة ببوادئ الجبن .

ووجد في دراسات مسحية أجريت في كلية الطب والزراعة/ جامعة بغداد ان الجبن المصنع محليا أي جبن الأرياف تكثر فيه *Br. abortus* بالدرجة الاولى و*Br. melitensis* بالدرجة الثانية ، وعند دراسة تضاد بكتريا حامض اللاكتيك المعزولة من الاجبان كانت لها فعاليات تضادية مع بكتريا البروسيلا ، في حين ان البكتريا المعزولة من الحليب الخام أثرت بشكل اكبر على عزلات البروسيلا الموجودة في الجبن ، اما البكتريا المعزولة من اللبن الريفي فكانت اكثره تاثيرا في

البروسيلا ، لذلك فان مثل هذه النتائج يمكن ان تقود الى إمكانية تحضير جبن ريفي سليم . وفي دراسات اخرى امكن تحضير جبن علاجي (يراجع فصل المنتجات العلاجية) .

وتستعمل بكتريا البروسيلا المضعفة لتلقيح الحيوانات وخاصة الأبقار ولكن هذه تشكل بعض المخاطر خاصة في الأبقار الحوامل اذ تسبب البكتريا *Br. abortus* سلالة 19 إجهاض لها . ولكن مؤخرا حضرت بكتريا حامض اللاكتيك وعلى وجه الخصوص *Lc. lactis* التي حورت وراثيا لتحمل المستضد L7/L12 وهو بروتين سايتوبلازمي للبروسيلا ومن صفاته إثارة الاستجابة المناعية ، لإعطائها على شكل لقاحات حية (يراجع موضوع الهندسة الوراثية)

عدم تحمل اللاكتوز Lactose intolerance :

حالة عدم تحمل اللاكتوز حالة مرضية تحصل للإنسان نتيجة لقلة كمية او فعالية انزيم اللاكتيز Lactase (β-galactosidase) في أمعاء الإنسان او قد يوجد وجه آخر لها وهو قلة امتصاصه Lactose malabsorption ، وتحصل للبالغين وتصل نسبتها الى حوالي 5- 15 % في دول آسيا وأفريقيا وأمريكا ، ولكنها ترتفع عند سكان أقطار أمريكيا الجنوبية اذ تصل الى من 50-100% . ان فقدان إنزيم اللاكتيز يمكن ان يكون حالة مكتسبة وليست وراثية او طبيعية كما يحدث عقب العلاج بالأشعة لمنطقة الحوض او إصابة الامعاء بفيروسات الروتا التي تؤدي الى تدمير خلايا الحافات الفرشاتية Brush-border cells المنتجة للانزيم .

واعطاء خلايا حية في اللبن يؤدي الى علاج الحالة ويمكن إعطاؤها في منتجات اخرى . ووجد ان اللبن هو الأفضل حيث يقلل من كمية الهيدروجين في الزفير الذي يستعمل كمقياس على تحلل اللاكتوز . والبكتريا المنشطرة لا تساعد في علاج الحالة ولكن *Lb. bulgaricus* لها قابلية كبيرة للعلاج . وهذا يعني ان الحالة ممكن علاجها باللبن التقليدي المصنع من الاحياء الصناعية وليست العلاجية وذلك لانها تحتوي على انزيم اللاكتيز وأفضل النتائج يمكن الحصول عليها عندما تكون البكتريا حية ، إضافة الى ان اللبن المستهلك يمكن ان يحفز أي لاكتيز معوي لا يزال فعالا ، اضافة الى ان اللبن يأخذ وقتا طويلا في القناة الهضمية اكثر من الحليب مما يسمح للفرصة بتكسر كميات من اللاكتوز المتبقية من اللبن بعد تخمره ، اضافة الى ان الانزيم في اللبن يمكن ان يصل الامعاء بشكل فعال

الاحياء العلاجية والكولسترول :

الكولسترول Cholesterol من جزئيات الحياة المهمة وذلك لدوره في :

- الاشتراك في تخليق الأغشية الخلوية والحفاظ عليها .
- يكون طليعة لتخليق حوامض الصفراء .

- يكون طليعة لتخليق عددا من الهرمونات الستريدوية Steroid hormones .

ومصادر الكولسترول في الجسم يكون اقل من نصفها من التخليق داخل الجسم ، اما الباقي فتاتي من مصادر خارجية وهي الأغذية خاصة الغنية بالدهون . ويخلق الكولسترول في الجسم في الكبد الذي يشارك بحوالي 10% والأمعاء التي تساهم بـ 15% من الكميات المخلقة يوميا في جسم الانسان ، فلأشخاص العاديون يخلق جسمهم حوالي 1غم / يوم ويتناولون حوالي 0.3 غم / يوم وبذلك يكون المستوى الطبيعي للكولسترول 150- 200 ملغم / 100 مللتر .

تخليق الكولسترول ودوره في الجسم :

يخلق الكولسترول في خلايا الكبد او في خلايا الامعاء وعمليات التخليق في هذين المركزين تعتمد على نوع الكائن الحي . ففي العديد من الحيوانات تقوم خلايا الامعاء المخاطية بإنتاجه وإفرازه الى جوف الامعاء . اما في الانسان فانه يخلق في خلايا الامعاء ويدخل فراغ الامعاء عن طريق انسلاخ وتقشر خلايا الامعاء .

ولعملية التخليق عدة مراحل او خطوات تبدأ من المركب ثنائي ذرات الكاربون وهي الخلات الموجودة في Acetyl CoA الذي يحول بالانزيم 3-hydroxy-3 methylglutaryl- CoA (HMG-CoA) reductase الى مركب اخر ثم تستمر التحولات الى ان يتكون الكولسترول الذي يمكن ان يذهب الى الغدد الصم لتخليق الهرمونات او الى الكبد لتخليق حوامض الصفراء . ويشارك الكولسترول في عمليات تنظيم تخليقه بعدة آليات. ويستعمل جزءا منه في تخليق حوامض الصفراء . وينقل الكولسترول المخلق داخل الجسم وكذلك الآتي مع الطعام بواسطة البروتينات الدهنية الموجودة في بلازما الدم وهي البروتينات قليلة الكثافة Low density lipoproteins (LDL) التي تقوم بنقله الى المواقع التي تحتاجه ، وكذلك تساهم في نقل مشتقاته مثل Cholesteryl esters التي تمثل الشكل الذي يخزن به الكولسترول في الخلايا ، كما ان البروتينات الدهنية قليلة الكثافة جدا Very low density lipoproteins (VLDL) تشارك في عمليات النقل ايضا. وتساهم البروتينات الدهنية عالية الكثافة High density lipoproteins (HDL) في تفاعلات او وظائف عكسية ، واستعمال البروتينات الناقلة هذه يعتمد على نوع الكائن .

ويجب ان تكون عمليات تخليق الكولسترول واستهلاكه في الجسم مسيطر عليها بشكل صارم لانه يترسب عند الزيادة هو والبروتينات الدهنية الغنية به في الشرايين التاجية Coronary arteries وهو ما يطلق عليه فرط كولسترول الدم Hypercholesterolemia وهذا التراكم يؤدي في النهاية الى تصلب الشرايين Atherosclerosis الذي ينجم عنه أمراض الشرايين التاجية . ومن إحدى وسائل السيطرة هو العناية بالتغذية وكذلك استعمال الاحياء العلاجية . والحقيقة انه يوجد تغاير كبير في مستوى الكولسترول في بلازما الدم اذ انه يتأثر بالغذاء والأحياء العلاجية .

والكولسترول المخلق الذي ينقل بواسطة LDL يحول بعضه الى أحماض الصفراء وهي احدى الطرق للتخلص من الكولسترول الزائد التي تفرز الى غدة الصفراء (المرارة Gallbladder) . واكثر حوامض الصفراء وفرة هو Chenodeoxy cholate (45 %) وحامض الكوليك Cholic acid (31 %) وتدعى هذه بحوامض الصفراء الأولية . وفي الامعاء تحول هذه الى حوامض ثانوية بتأثير فلورا الامعاء فينتج Lithocholate من الحامض الاول و Deoxycholate من الحامض الثاني وتعود هذه الحوامض من الامعاء الى الكبد عن طريق الدورة البوابية Portal circulation . وفي الكبد يتم ربط المجاميع الكاربوكسيلية لكل من حوامض الصفراء الأولية والثانوية بآصرة اميدية Amide bond لتكون الأملاح المقترنة ، وترتبط عادة الى الحامض الاميني الكلايسين لتكون Glycoconjugates وللـ Taurine لتكون Tauroconjugates .

وتقوم مكونات الصفراء بعدد من الوظائف للجسم :

- ان تخليقها وطرحها خارج الجسم يمثل اهم الآليات للتخلص من الكولسترول الزائد .
- حوامض الصفراء والدهون الفوسفاتية تساعد على إذابة الكولسترول في الصفراء وبذلك تمنع ترسبه في كيس الصفراء .
- تساعد في هضم الدهون (الكليسيريدات الثلاثية) بعملها كمستحلبات وبالتالي تجعل المواد الدهنية عرضة لإنزيمات تحليل الدهون البنكرياسية .
- تساعد في امتصاص الفيتامينات الذائبة في الدهون في الامعاء .

ان حوامض الصفراء المقترنة Conjugated تدخل القناة الهضمية في الاثنى عشري (Duodenum) لتقوم بالفعاليات أعلاه ، ويمتص حوالي 95 % منها في الامعاء الدقيقة لكل دورة والباقي يذهب الى الامعاء الغليظة ليتعرض الى تأثير الاحياء الموجودة هناك مثل Bacteriodes . ان الجزء الهارب من أملاح الصفراء الأولية يتحول بتأثير الاحياء الى حوامض الصفراء الثانوية بعد فك ارتباطه من الحوامض الامينية (الكلايسين والتورين) بواسطة عملية فك الاقتران Deconjugation ، والمركبات الثانوية الناتجة يفرز حوالي 70 % منها الى خارج الجسم مع الغائط و30 % يعاد امتصاصه ورجوعه الى الكبد ضمن دورة الامعاء الكبدية Enterohepatic circulation ويعوض المفقود بواسطة تخليق كميات أخرى من حوامض الصفراء من الكولسترول . ولذلك فان زيادة الشكل غير المقترن لأحماض الصفراء دليل على زيادة نمو ونشاط البكتريا في الامعاء . وزيادة إفراز وإخراج حوامض الصفراء يؤدي الى زيادة تحويل الكولسترول الى حوامض صفراء وبالتالي التقليل من مستواه في الجسم .

علاقة الاحياء العلاجية بالكولسترول :

تم ملاحظة تأثير بكتريا حامض اللاكتيك منذ زمن بعيد وقد صدر أول تقرير حول تخفيض الكولسترول منتصف سبعينيات القرن الماضي ، وهذا جاء من ملاحظة ان الشعوب التي تستهلك الألبان المتخمرة تنخفض مستويات الكولسترول عندهم . وقد درست هذه بشكل علمي في الحيوانات أكثر من الانسان واستعملت في تجارب عديدة في جامعة بغداد ووجد ان العديد من بكتريا حامض اللاكتيك وخاصة *Lb. acidophilus* لها تأثير كبير في خفض الكولسترول في فئران أطعمت أغذية غنية بالكولسترول .

أما الدراسات في الانسان فقد أشارت ايضا الى تأثير البكتريا الفعال في خفض الكولسترول مثل سلالات من العصيات اللبنية والبكتريا المنشطرة المضافة الى حليب فرز او حليب كامل الدسم وكذلك حليب مبستر وأخر غير مبستر ، وكانت حصيلة النتائج ان استهلاك هذه المنتجات لمدة أسبوع يؤدي الى خفض الكولسترول بنسبة 5- 10 % واستمراره لمدة أربعة أسابيع وكانت النتائج أكثر تشجيعا عند استعمال أغذية منخفضة الدهون . ومن دراسات موسعة لأشخاص مصابين بارتفاع الكولسترول تم إعطائهم البكتريا المنشطرة بمعدل 10^9 / غرام فأدى ذلك الى انخفاض الكولسترول الى النصف ، اما الأشخاص اللذين لديهم ارتفاع كولسترول معتدل (240 ملغم / 100مللتر) وأعطوا Bifidus milk الحاوي على *Bif. longum* فقد حسن ذلك من صورة الدهون في الجسم فقد قلل من الكولسترول المرتبط بالبروتينات قليلة الكثافة LDL-cholesterol وكذلك الكليسيريدات الثلاثية ولم يؤثر في البروتينات الدهنية عالية الكثافة HDL .

وتساهم في هذا المجال سلالات من بكتريا *Lb. acidophilus* فاستعمال المستحضر العلاجي Proviva المسوق في السويد والحاوي على البكتريا يؤدي الى خفض الكولسترول الكلي وكذلك LDL في الأشخاص اللذين لديهم ارتفاع معتدل . وكذلك فان استهلاك *Ent. faecium* لمدة4 -8 أسابيع يؤدي الى تقليل الكولسترول الكلي بنسبة4 % والبروتينات واطئة الكثافة بنسبة 5 % .

وعلى العموم فان استهلاك الاحياء العلاجية ولمدة أسابيع يؤدي الى خفض الكولسترول الكلي و LDL ومن تأثيراته الايجابية هو تغيير نسبة LDL : HDL ففي إحدى الدراسات انخفضت النسبة من 3.24 الى 2.48 ولكن هذه التأثيرات المفيدة قد تحجب باستعمال أغذية غنية بالدهون . وقد لوحظ من الدراسات العديدة ان تأثير البكتريا الايجابي في خفض الكولسترول يزداد عندما تقرن باستعمال مساعدات العلاج مثل متعددات الفركتوز FOS أي استعمال حالة العلاج التآزري الحيوي .

مواصفات السلالات المستعملة في خفض الكولسترول :

قد تختلف السلالات فيما بينها في القابلية على خفض الكولسترول ولكن الصفة العامة التي تتصف بها هو مقاومتها لأملاح الصفراء وان كانت هذه الصفة ليست مطلقة كما سيأتي ذكره لاحقا .فبعض سلالات *Lb. acidophilus* التي تستطيع النمو بوجود حوامض الصفراء وتستطيع تمثيل الكولسترول كان لها اثر كبير في خفض مستوى الكولسترول مثل السلالة المعروفة بـ NCFM ، في حين ان سلالات أخرى مشابه في مقاومتها لأملاح الصفراء ولكنها غير قادرة على تمثيل الكولسترول لم يكن لها اثر في خفض الكولسترول .

ومن الدراسات خارج الجسم وجد ان السلالات المعزولة من الانسان تخفض الكولسترول في الوسط بنسبة تصل الى 0.04- 47 % أي ان التخفيض كان بنسبة 29.7-0.09 ملغم من الكولسترول المضاف لكل غم من الخلايا ، كما يمكن لبعض السلالات إزالة الكولسترول تحت الظروف اللاهوائية وبوجود حوامض الصفراء ، فالسلالات ذات الأصل البشري وجد انها تتحمل تراكيز الصفراء لحد 1000 ملغم / لتر ، وكذلك تتحمل رقم هيدروجيني 3 لمدة ساعتين ، فمثل هذه المواصفات تعد قياسية لتحمل الحامض وعبورها المعدة وبقاءها في الامعاء الحاوية على مكونات الصفراء .

الآليات التي تؤثر بها الاحياء العلاجية لخفض الكولسترول :

هناك عددا من الآليات التي أثبتت ان الاحياء العلاجية يمكن ان تؤثر بها على الكولسترول سواء داخل او خارج الجسم الحي ومنها :

- العمل على اقتران وفك اقتران أملاح الصفراء بواسطة انزيمات التحلل المائي ففك الاقتران لأملاح الصفراء يعد من الآليات المهمة للتخلص من الكولسترول وهي آليات غير مباشرة . فعملية فك الاقتران تحدث تشكل بشكل طبيعي في الناس العاديين إثناء الدورة المعوية الكبدية . ففي الامعاء يحصل فك الاقتران بتأثير الفلورا المعوية وخاصة البكتريا اللاهوائية فحوامض الصفراء تفرز في الاثنى عشري بشكل مقترن مع الكلايسين او والتورين ومعظم سلالات البكتريا المنشطرة يمكن ان تحلل Na-taurocholate وNa-glycocholate في القولون بإنزيمات أصيلة غير مستحثة تفرز خارج الخلايا مثل انتاج إنزيم Bile salt hydrolase (BSH) والذي يؤدي الى خفض إعادة امتصاص الكولسترول وزيادة المفرز منه الى خارج الجسم .

وعليه فان السلالات المرشحة لخفض الكولسترول تكون الحاوية على BSH الذي يساعد في التخلص من أملاح الصفراء مع الغائط والتقليل من قابلية هضم الدهون . وتختلف السلالات في قابليتها على فك ارتباط حوامض الصفراء المقترنة ، فالبعض لا يستطيع القيام بهذه الفعالية والبعض الأخر يفك اقتران احد الأشكال المقترنة وأنواع أخرى تفك اقتران الشكلين . فمعظم سلالات *Lb.*

acidophilus تفك ارتباط Taurocholate والبعض الأخر يفك ارتباط Glycocholate في حين ان معظم سلالات *Lb. casei* لا تقوم بهذه الفعاليات ، كما ان البعض منها تقوم بالفعاليات عند انخفاض جهد الأكسدة والاختزال لذلك تضاف Thioglycholate لهذا الغرض . وفي الفئران وجد ان عملية فك الاقتران تصل الى 86% من حوامض الصفراء في اللفائفي وحوالي 74% في منطقة الاعور من الامعاء .

ان الشكل المقترن لحوامض الصفراء يكون اقل تأثيرا من الشكل غير المقترن في الاحياء الموجودة في القناة الهضمية ولذلك فان عملية فك الاقتران لحوامض الصفراء يمكن ان تزيد من تضاد العصيات اللبنية المعوية تجاه الممرضات المعوية وبالتالي تحسين بيئة الامعاء بالإضافة الى تأثيرها بشكل كبير على ايض الدهون من خلال زيادة استخدام الكولسترول للتعويض عن حوامض الصفراء المفقودة .

- تمثيل الكولسترول من قبل البكتريا وقد لوحظ ان زيادة تمثيل الكولسترول تزداد بزيادة تركيز حوامض الصفراء فمثلا *Lb. brevis* NRIC 1684 و *Lb. casei* Shirota و *Ent. faecalis* يمكن ان تمثل 5 ملغم / غم من الخلايا . وفي مثل هذه السلالات القادرة على تمثيل الكولسترول يجب ان تكون قادرة على النمو بوجود أملاح الصفراء وهذه الصفة موجودة في السلالات المعزولة من الانسان فالبعض منها يمكن ان يتحمل 4000 ملغم / لتر التي تمثل أربعة أضعاف التركيز القياسي لتحمل الصفراء . والحقيقة ان درجة التحمل لا تنعكس على تمثيل الكولسترول فزيادة التحمل لا تعني زيادة في ازالة الكولسترول .
- التأثير الفسلجي لمنتجات التخمر ، يمكن ان تؤثر هذه المنتجات وخاصة الحوامض الدهنية قصيرة السلسلة مثل البروبيونات الناتجة من تخمر الكاربوهيدرات في القناة الهضمية على تخليق الكولسترول في الكبد وإعادة توزيعه بين البلازما والكبد .

وبعض أنواع البكتريا تقلل إنزيم HMG-Co A reductase الأساسي في تخليق الكولسترول ومثل هذه الفعالية تظهر في بعض سلالات البكتريا المنشطرة . كما ان تمثيل العصيات لحامض الاوروتيك والمواد الناتجة عن ذلك تساهم في خفض الكولسترول . وفي سلالات أخرى وجد ان كل من حامض الاوروتيك وحامض Hydroxmethylglutaric acid هي المسئولة عن خفض الكولسترول .

- آليات أخرى ، الآليات المذكورة اعلاه قد لا تجتمع او تنتشر بشكل منسق في السلالات . فبعض السلالات تقلل من الكولسترول من خلال ربطه الى جدرانها الخلوية . في حين ان سلالات أخرى تتداخل مع عملية الامتصاص في الامعاء ، في حين تقوم بعض السلالات الأخرى بتحويل

الكولسترول الى Coprostanol الذي يفرز في الغائط ، إضافة الى آليات أخرى قد يكون البعض منها غير واضح .

امراض أخرى :

استعملت الاحياء العلاجية في علاج العديد من الإعتلالات والإصابات الاخرى وفيما يلي ذكر البعض على سبيل المثال لا الحصر :

إعتلالات الكبد : تضطرب وظائف الكبد في بعض الأحيان كما في حالة فشل الكبد فيصبح غير قادرا على إزالة الامونيا التي تنتج من الامعاء بتأثير إنزيم اليوريز البكتيري ويتم امتصاصها والتخلص من سميتها في الكبد في الأشخاص الأصحاء .

ولكن في حالة فشل الكبد يصبح غير قادرا على إزالتها مما يؤدي الى زيادة تركيزها مؤديا الى ما يسمى الاعتلال الدماغي Encephalopathy ، لذلك فأن تغير فلورا الامعاء بإعطاء الاحياء العلاجية مثل بكتريا حامض اللاكتيك وإحلالها محل الاحياء ذات الفعالية العالية لإنتاج اليوريز قد يكون من العلاجات او الوسائل الناجعة بالنسبة لهؤلاء المرضى ، وقد وجد ان إعطاء *Lb. acidophilus* لهؤلاء المرضى قد أدى الى انخفاض إنزيم اليوريز في الغائط وانخفاض مستوى الامونيا في الدم .

وتستعمل في مثل هذه الحالات ايضا البكتريا *Ent. faecium* SF 68 ويؤدي استعمالها الى خفض الامونيا في الدم واستعادة الحالة العقلية كما تحسنت الحالة النفسية لهم ، كما ان هذه البكتريا العلاجية بقيت مدة طويلة دون تأثيرات جانبية .

معالجة التأثيرات الجانبية للعلاج ألشعاعي : يؤثر التشعيع وخاصة في منطقة الحوض الى تأثيرات جانبية وذلك بتأثيره على الفلورا الطبيعية للأمعاء مما يؤدي الى ظهور التهاب القولون التقرحي المتعلق بالإشعاع Radiotherapy –related colitis وفي هذه الحالة يضطر الى قطع العلاج ألشعاعي والاستعاضة عنه بالعلاجات الكيماوية . ومثل هذه الحالة تحصل في الأشخاص الذين يعانون من أمراض سرطانية خاصة في الأجهزة التناسلية . وعند معاملة مجموعة من النساء اللواتي يتعرضن لجرعة 5000cGy بإعطائهن 2×10^{9} خلية حية من *Lb. acidophilus* NDCO1478 في حليب خالي من الدهن ويحتوي على اللاكتوز ليدعم نمو العصيات اللبنية إضافة الى إنزيم اللاكتيز لتحليل اللاكتوز قبل خمسة أيام من إعطاء الجرعة الإشعاعية وأثناء المعاملة بالإشعاع والاستمرار لمدة عشرة أيام بعد جرعة العلاج ، فوجد ان استعمال العصيات اللبنية قد قلل الى حد كبير الأعراض الجانبية

وشدتها مثل منع الإسهال المرافق للعلاج ألشعاعي . وتستعمل البكتريا المنشطرة للغرض نفسه للتخفيف من الأعراض التي تعقب العلاج ألشعاعي والكيماوي في مرضى السرطان .

أما في الفئران فقد وجد ان إعطاء السلالة GG يؤدي الى تقليل تأثير الإشعاع القاتل ويقلل من نسب الموت المبكر للفئران الناتج عن التجرثم المسببة عن بكتريا *Pseudomonas* .

علاج الجروح : تذكر الأساطير ان استعمال الحليب المخمر يمكن ان يسرع من التئام الجروح والإصابات التي تحدث فيها وكان هذا قبل اكتشاف المطهرات والمضادات الحيوية . ولكن المتوقع ان لا تكون العلاجات موضعية ولكن ممكن ان تكون جهازية . وفي الدراسات التي أجريت على الحيوانات وجد ان استعمال *Lb. fermentum* RC 14 والبروتينات المنتجة منها تمنع الإصابة الشديدة ببكتريا *Staph. aureus* بعد الجراحة .

إضافة الى ذلك وجد ان إعطاء الاحياء العلاجية قبل إجراء العمليات الجراحية للانسان وبعدها يكون أفضل من إعطاء المضادات الحيوية للتخلص من التلوث في الامعاء وتلافي التعقيدات التي تحصل عقب العمليات الكبرى وقد استعملت لهذا الغرض البكتريا *Lb. plantarum* 99 . ولذلك يكون للأحياء العلاجية مجالا واسعا للتطبيق في مثل هذه الحالات خاصة وان بكتريا *Staph. aureus* الملوثة لأجواء المستشفيات التي اغلبها في الوقت الحاضر من مجموعة التي يطلق عليها MRSAوبعضها مقاومة للعديد من المضادات الحيوية وحتى الفانكوميسين الذي يعد الاختيار الأخير لمعالجة مثل هذه الإصابات .

وإعطاء الاحياء العلاجية ليس بالضرورة ان يكون على الجروح او الجلد كما ذكر أعلاه إلا انه يفيد في العديد من الحالات منها زراعة الأعضاء فعند إعطاء البكتريا *Lb. plantarum* 99 عند زراعة الكبد ، فالمرضى معرضون لخطر الإصابة إضافة الى حالة رفض الأعضاء فكانت لها نتائج ايجابية .

وفي الأشخاص الذين في حالة سوء تغذية والمرضى محبطي المناعة فان الاحياء المرضية قد لا تكون خارجية المنشأ وإنما تكون ذاتية من فلورا الامعاء ويمكن ان تنتشر مسببة حالة التسمم Endotoxemia مؤدية الى حدوث تعقيدات كبيرة في هذه الفئة من الناس، لذلك فإعطائهم الاحياء العلاجية يخفف من هذه التعقيدات . وفي حالة اجراء العمليات الجراحية لمثل هؤلاء الناس اعطو العصيات اللبنية بعد 24 ساعة من الجراحة واستمر باعطائهم الاحياء اربعة مرات يوميا ولمدة ستة اسابيع وادت هذه المعاملة الى حدوث الاصابة عند 13% منهم مقابل حدوثها في 48 % من المجموعة غير المعاملة ، اذ لم تحصل عندهم اصابة بذات الرئة Pneumonia او الخراجات او التهاب الاقنية الصفراوية Cholangitis

كما ان استعمال الحياء العلاجية مع مساعدات العلاج الحيوي يكون افضل ومفيد في علاج خراجات والتهاب البنكرياس الحاد عند ابتلاع خلايا مجفدة مع ألياف الشوفان (Oat) لمدة اسبوع .

ولا تقتصر الحالات على استعمال الاحياء العلاجية نفسها وانما يكون لمنتجاتها تاثيرعلى الاحياء الممرضة مثل مركب ثنائي الاستيل الذي ينتج بشكل رئيس من البكتريا *Lc. lactis* ssp *cremoris* من السترات ويعد من مركبات نكهة الزبد فله تأثير كبير على العديد من البكتريا الملوثة للمستشفيات والبكتريا المرضية المعزولة من اصابات خارجية للجسم مثل الجروح والاذن . وهو واسع التأثير اذ يؤثر على بكتريا موجبة لصبغة كرام مثل *Staph. aureus*و *Strep. pyogenes* وبكتريا سالبة لصبغة كرام مثل عدد من انواع الجنس *Pseudomonas*وأنواع تابعة لجنس *Proteus* و *E. coli*المعزولة من مناطق مختلفة ، ومن الجدير بالذكر ان مئات العزلات التي استعملت والمعزولة من مستشفيات بغداد كانت مقاومة لعدد من المضادات الحيوية حتى ان البعض منها كانت مقاومة لأثني عشر من المضادات . كما ان استعمال المركب المخفف في مسح الجروح المتقيحة أدى الى شفائها بسرعة كبيرة .

ان تأثير الاحياء العلاجية أو المواد الناتجة منها لا يمكن حصرها فهناك العديد من الحالات الخاصة وقد تكون الحالات ممارسات تراثية او شعبية دون الأعتماد على اساس علمي . ففي أرياف العراق تحصل إصابات بجدري الدجاج Chicken pox الذي يؤدي الى خسائر فادحة والعلاج الناجع في مثل هذه الحالات هو دهن المناطق المصابة لمرتين او أكثر بزبد ريفي أي زبد منضج ناتج من حليب مخمر ببوادئ محلية خليطة والحقيقة انه بالمشاهدات العينية كان النتائج جيدة جدا إذ تختفي الإصابات ويعود الجلد في المناطق العارية من الريش في رأس الطير الى حالته الطبيعية في مدة تكاد تكون قياسية وهي بين يومين الى أربعة أيام .

علاقة الاحياء العلاجية بالجهاز التناسلي الانثوي

الموضوع   الصفحة

علاقة الاحياء العلاجية بالجهاز التناسلي الأنثوي

ان تطبيقات الاحياء العلاجية يمكن ان تتعدى استهلاك الاغذية الحاوية عليها ، وهنا يقصد به القناة ألتناسلية النسوية وخا صة منطقة المهبل . ومنطقة المهبل تحوي العديد من الاحياء التي تكون عند حالة التوازن تحوي زيادة من العصيات اللبنية . وتسجل حالة فلورا المهبل باستعمال Nugent score الذي يعتمد على تحديد الاحياء بواسطة المجهر لمسحات من المهبل .

ولكن من الجدير بالذكر ان نمط الفلورا ومكوناتها تكون غير ثابتة وتتغير أثناء دورة الحيض الشهرية Menstrual cycle وبعد سان اليأس حتى في النساء التي لا تظهر عليهن اعراض الالتهابات وتتاثر بهرمون Oestrogen واستعمال الادوية المهبلية مبيد النطف Spermicide وباستعمال التقنيات الحديثة مثل PCR وتحديد توالي القواعد النتروجينية للجينات المشفرة 16S rRNA وخاصة 16S-3S spacer ، وجد انه في النساء السليمات يطغى وجود العصيات اللبنية مثل *Lb. crispatus* ، *Lb. jensenii* ، *Lb. gasseri* ، *Lb. iners* ، *Lb. vaginalis* ، *Lb. delbrueckii* و *Bif . breve* . اما في حالة الاصابة بالتهاب المهبل البكتيري Bacterial vaginosis فتأتي بكتريا *Gardnerella vaginalis* و *Atopobium vaginae* بالدرجة الرئيسية .

وفي حالة الاصابة تكثر مجموعة اللاهوائيات مثل *Ap. vaginae* و *G. vaginalis*اضافة الى

Anaerococcus vaginalis , *Anaerococcus tetradius* , *Aerococcus christensenii* , *Actinomyces neuii* , *Bacteriodes* , *Dialister* spp , *Fingoldia manga* , *Gemella morbillorum* , *Mobiluncus curtisii* , *Mycoplasma hominis* , *Peptoniphilus* spp , *Peptostreptococcus Varibaculum cambriense* , *Prevotella bivia, Pre. ruminicola, Ureaplasma urealyticum*

وتوجد أنواع وأجناس اخرى ربما يكشف النقاب عنها عند حصول تطورات حديثة لتصنيفها مثل Diphtheroids التي تسجل في مسحات المهبل من قبل العديد من المايكروبايوجين على انها تابعة للعصيات اللبنية والتي تترتب بشكل الحروف الصينية ولكنها تمثل مجموعة منفصلة من فلورا المهبل .

ومثلما ذكر ان فلورا المهبل تسجل بشكل Nugent score ، فتكون الدرجة الأولى Grade I عندما تكون المسحة حاوية على العصيات اللبنية وبشكل خاص *Lb. crispatus* ،

GIIb عند وجود عصيات اخرى ، ودرجات أوطأ عند وجود Diphtheroids او ما يطلق عليها *Lactobacillus* morphotypes . وتقل درجة التسجيل في حالة الالتهابات وعندما يسجل وجود البكتريا السالبة لصبغة كرام واللاهوائيات مثل *G. vaginalis* او الممرضات للجهاز البولي مثل *E. coli* والبكتريا الكروية الموجبة لصبغة كرام مثلβ -Streptococci و Enterococci فتكون الدرجة 8- 10 . اما القيم بين 3 الى 8 فتشير الى وجود الممرضات مع العصيات اللبنية وهي حالة انتقالية .

حماية المهبل بالعصيات اللبنية :

منذ سبعينات القرن المنصرم اكتشف ان وجود العصيات اللبنية تعمل كحاجز ضد الإصابات . ولكن قبل ذلك الوقت كانت توجد ممارسات عامة في أفريقيا والعراق وربما غيرها من البلدان والتي تجري في البيوت او العيادات النسائية وهي استعمال اللبن (غير التقليدي المصنع في المعامل) وانما المصنع في الأرياف لمسح المهبل عند وجود التهابات وسيلانات في المنطقة التناسلية الأنثوية ، وقد وجد بالتجربة وبنتائج غير منشورة ان اللبن التقليدي المصنع بالبادئ *Lb. bulgaricus , S. thermophilus* لا يفيد في مثل هذه الحالات ، ومثل هذه التجارب والممارسات العفوية أشارت ايضا الى ان إفرازات المهبل لشابات سليمات يمكن ان تقضي على بكتريا *Staph. aureus* المسببة للدمامل والقيح .

اما الدراسات الموثقة والمنشورة في مطلع القرن الحالي فقد وجد ان اعطاء بعض السلالات من العصيات اللبنية مثل *Lb. rhamnosus* GR-1 و *Lb. fermentum* RC-4 عن طريق الفم وبجرع 10^{9}-10^{10} ادى الى انتقال هذه السلالات الى منطقة المستقيم Rectum ثم الى المهبل ويؤدي الى القضاء على البكتريا القولونية Coliform والخمائر في المهبل مما ساعد في استرجاع الفلورا الطبيعية في اكثر من 80 % من النساء اللواتي يعانين من التهاب المهبل البكتيري كما دلت على ذلك نتائج تسجيل مؤشر نيوجنت .

خطر قلة العصيات اللبنية في المهبل :

ان التغييرات الخطيرة التي يمكن ان تحصل في بيئة المهبل يمكن ان تؤدي الى نتائج خطيرة ، وقد تكون التغييرات كما ذكر اعلاه نتيجة للتغيرات الهرمونية والحمل . ففي مثل هذه المجموعة المعرضة للخطر تصاب النساء بالتهاب المهبل البكتيري الذي يحصل في المجتمعات الأمريكية والأوربية بنسبة تصل الى 5 - 36 % وفق إحصائيات عام 2005 ، وهذه تؤدي الى ولادة الخدج اثناء مدة الحمل الأولى بنسبة 7-11% اضافة الى موت الأجنة ، كما انها تكون السبب في ان 75% من الاطفال المولودين يعانون من عاهات وأمراض اثناء حياتهم مثل اضطرابات عصبية واعتلالات في الجهاز المناعي مثل ظهور انواع من الحساسية .

التهاب المهبل البكتيري : ويحصل هذا عندما تحل المسببات مثل *G. vaginalis* و *Ap.vaginae* اللاهوائية محل العصيات اللبنية وهذه الحالة (أي التهاب المهبل البكتيري) تؤدي كما ذكر اعلاه الى حالات الولادة المبكرة ، ولكن قد تكون الأسباب بكتريا اخرى لم تشخص بعد خاصة وان بعض البكتريا لا تنمو في مزارع لتشخيصها ، ويمكن ان يحصل المرض بعد استعمال المضادات الحيوية . فقد أمكن استعادة الفلورا الطبيعية في 70% من النساء اللواتي استعملن Metronidazole بعد إعطائهن بكتريا *Lb. crispatus* و *L* RC- 4 *Lb. fermentum* و *Lb. rhamnosus* GR-1 عن طريق المهبل والتي يمكن ان تبقى لعدة شهر بعد إدخالها .

الإصابة بالايدز وغيرها من الإصابات:

- تمثل النساء اللواتي يعانين من التهاب المهبل البكتيري مجموعة خطر (Risk group) للإصابة بفيروس HIV اذ سجلت علاقة قوية موجبة بين الاصابة بفيروس الايدز ووجود التهاب المهبل البكتيري ، وكانت العلاقة سالبة بين الاصابة بالفيروس ووجود العصيات اللبنية والتي يعتقد ان ذلك يعود الى الحموضة التي تتطور في المهبل عند وجود العصيات اللبنية ، اذ وجد في دراسات خارج الجسم ان رائق النمو لبعض سلالات العصيات اللبنية مثل *Lb. fermentum* RC-4 و *Lb. rhamnosus* **GR-1** تقضي على فيروس HIV بعدة دقائق . ولكن من المحتمل ان تغلق العصيات اللبنية بعض مستلمات الفيروس على الخلايا $CD4^+$ لذلك يعول على استعمال العصيات اللبنية في معالجة انتشار الايدز الواسع فهي تكون رخيصة والمعالجة ممكنة سواء عن طريق الفم او في المهبل وبذا يمكن ان تصل الى اعداد كبيرة من المرضى خاصة في قارة أفريقيا التي يكون وصول العلاجات الكيماوية صعبا ومكلفا .

- إضافة الى ما ذكر اعلاه فان انخفاض نسبة العصيات اللبنية يكون مرافقا لإصابات الطفيلي *Trichomonas vaginalis* (Trichomoniasis) وقد أوضحت بعض الدراسات على نساء عراقيات ان الاستدلال على وجود الطفيلي يمكن ان يتم بقياس الرقم الهيدروجيني للمهبل الذي يرتفع عند قلة العصيات اللبنية .

- وتوجد علاقة عكسية بين وجود العصيات اللبنية في المهبل والإصابة ببكتريا السيلان *Neisseria gonorrhoeae* .

- ومن الاصابات لاخرى التي وجد ان لفلورا المهبل تاثير كبير عليها هي الالتهابات الناتجة عن الخمائر Yeast vaginitis والذي يكون السبب في معظم الأحيان خميرة *Candida albicans* ، اذ ان استزراع واستعمار المهبل بسلالات من العصيات اللبنية الملائمة يؤدي الى القضاء على هذا الالتهاب المزعج جدا .

- يؤدي استعمال العصيات المهبلية Vaginal lactobacilli الى منع اصابات القناة البولية Urinary tract infection (UTI) ، اضافة الى منع تكرارها في مجموعة الخطر مثل المصابات بداء السكري Diabetes mellitus .

الآليات التي تعمل بها العصيات اللبنية :

العصيات اللبنية هي الشائعة في الفلورا الطبيعية للمهبل في النساء السليمات وهي تلعب دورا اساسيا في الحفاظ على القناة البولية- التناسلية Urogenital tract بحالة سليمة . ولذلك فهي تظهر تاثيرا حافظا وحاميا للبيئة داخل المهبل من غزو الممرضات ، وهناك عدة آليات تمكن العصيات اللبنية من إضفاء تأثيرها الواقي في المهبل ومنها :

● التنافس وأبعاد الممرضات والإحلال مكانها ، وقد وجد ان صفة الالتصاق هي اهم الصفات للإحياء العلاجية (العصيات اللبنية) في المهبل ، وقد تكون اليات الالتصاق غير متخصصة فهي تشمل مثلا تداخلات كهربائية مستقرة او تداخلات كارهة للماء ، ولذلك فان صافي الشحنة على سطح البكتريا وكراهية الماء Hydrophobicity تؤثر بشكل كبير على الالتصاق وقوته ، فتقليل الشحنات السالبة على السطح يشجع العصيات اللبنية على الالتصاق الى أغشية الخلايا الطلائية والتي تعد الخطوة الأولى في استعمار الموقع والبقاء فيه وهي صفة تختلف باختلاف السلالة فقد وجدت اختلافات في قابلية التصاق البكتريا المهبلية الى خلايا هيلا HeLa cells (خلايا سرطانية معزولة من سرطان عنق الرحم Human carcinoma of cervix) ، فمثلا *Lb. gasserii* تكون عالية الالتصاق الى خلايا هيلا وتصل القابلية الى 20- 28 بكتريا / خلية .

وقد اثبت دور التداخلات الكهربائية المستقرة باستعمال مادة DEAE dextran ووجد ان التصاق العصيات اللبنية الى سطوح الأنسجة يتوسطه تداخلات الكهربائية المستقرة .

وتتأاثر عملية الالتصاق بعمر البكتريا والحالة الفسلجية لها ، فمثلا عملية التجفيد العادية تقلل من قابلية الخلايا على الالتصاق والذي ليس له علاقة بالعيوشية ، والمعتقد ان عملية التجفيد تؤدي الى تغيير التوزيع الفراغي للاصقات على سطوح البكتريا مؤدية الى قلة التصاقها .

فاستعمال بعض العصيات يؤدي ذلك الى إزالة حوالي 60 % من *C. albicans* و *G. vaginalis* الملتصقة الى الخلايا الطلائية خارج الجسم الحي .

● انتاج بيروكسيد الهيدروجين : تمتاز اغلب العصيات اللبنية المهلبية بإنتاجها لبيروكسيد الهيدروجين ولكن بدرجات متفاوتة فمثلا *Lb. crispatus* تنتج كميات كبيرة من البيروكسيد في حين *Lb. iners* تنتج كميات قليلة منه . والبيروكسيد عادة مادة قاتلة للممرضات اللاهوائية التي تصيب المهبل . وعليه فان نضوب العصيات اللبنية المنتجة للبيروكسيد يؤدي الى زيادة إصابة القناة

البولية - التناسلية ، ولذلك كانت صفة انتاج البيروكسيد من الصفات الرئيسة لانتخاب السلالات لإعداد المستحضرات الطبية .

- انتاج الحوامض العضوية : فمن المعروف ان بكتريا حامض اللاكتيك تنتج حامض اللاكتيك والبعض الاخر ينتج معه حامض الخليك وللحامضين تاثيرات قاتلة عندما تكون بشكل غير مفكك (كما سبق ذكره) ، لذا فانها تؤدي الى انخفاض الرقم الهيدروجيني للمهبل مما يجعل البيئة غير ملائمة لنمو الممرضات مثل *E. coli , G. vaginalis* .
- انتاج البكتريوسينات ، الأغلبية العظمى من العصيات اللبنية المهبلية تنتج البكتريوسينات وهي احدى الوسائل للحفاظ على البيئة المهلبية بحالة صحية فمثلا السلالات *Lb. gasseri* TLO 93c و *Lb. gasseri* TL 1439 وهي المعزولة من المهبل لنساء تركيات وجد انها تفرز بكتريوسينات تحوي على الدهون ولها مدى واسع من التأثيرات مثل تأثيرها في *E. coli , G. vaginalis , Protus vulgaris , Pseudomonas aeruginosa* بشكل عام ، وهناك سلالات تؤثر في *C. albicans* و *Staph. aureus* و *Staph. milleri* , وقد وجد ان العديد من العصيات اللبنية المعزولة من نساء عراقيات تؤثر في *N. gonorrhoeae* وانواع اخرى من الاحياء المسببة لالتهاب المهبل البكتيري ولكنها لا تؤثر في *C. albicans* المعزولة من المهبل او الجهاز الهضمي .
- التجمع Coaggregation وتظهر العصيات اللبنية المهبلية ظاهرة التجمع وهي ارتباط الاحياء الممرضة على سطوح العصيات وتكوينها تجمعات كبيرة يمكن ان تطرد الى الخارج ، كما ان عملية التجمع هذه تكون مهمة في استعادة الفلورا الطبيعية اذ تخلق بيئة موضعية حول الممرضات التي يزداد فيها تركيز المواد المثبطة التي تنتجها العصيات .
- الفعاليات الإنزيمية وتعد احد الآليات المؤثرة فالعصيات اللبنية تنتج كميات كبيرة من الانزيم Arginine deiminase (الذي مر ذكره سابقا) ويؤدي الى تقليل انتاج الأمينات المتعددة . ويقوم الانزيم بتحليل الارجينين الى Citrulline وامونيا بتفاعل غير قابل للرجوع وبذلك يقل الارجينين من الوسط المحيط وبذا يقل الاورنيثين الذي يكون البداية لتخليق الأمينات المتعددة .

ان الأمينات المتعددة توجد بتراكيز عالية عادة في إفرازات مهبل النساء المصابات بالتهاب المهبل البكتيري . وتساهم هذه في رفع الرقم الهيدروجيني الى حد يلاءم نمو الاحياء المرضية وتساهم الأمينات في إظهار الإعراض السريرية للالتهاب وخاصة ظهور الرائحة السمكية المميزة لإفراز المهبل الملتهب .

ولذلك فان بعض العصيات اللبنية المهبلية تمنع الممرضات من خلال نضوب وقلة الارجينين الذي يكون مصدرا مهما للكاربون والطاقة للبكتريا ولذلك فان العصيات اللبنية المهبلية التي تمتلك الانزيم

اعلاه تمثل رافدا مهما في العلاج البكتيري او العلاج الجرثومي Bacteriotherapy لالتهاب المهبل البكتيري .

- تنتج بعض العصيات اللبنية المهبلية مواد تقلل الشد السطحي Biosurfactants والتي تساعد في التخلص من بعض الاحياء .

المستحضرات الطبية لعلاج المهبل

ونظرا لما ذكر اعلاه كان هنالك توجها كبيرا لاستعمال الاحياء العلاجية في إصابات القناة البولية – التناسلية كبديل لاستعمال المضادات الحيوية والعلاج الكيماوي التقليدي . وذلك لان اغلب التجارب والاستعمالات التي طرحت في بعض المجتمعات تشير الى عدم وجود تاثيرات جانبية لاستعمال التحاميل المهبلية ، كما ان مثل هذه الاحياء تكون أمينة الاستعمال أثناء الحمل .

والحقيقة التي تخص المستحضرات الطبية الصيدلانية المطروحة في الأسواق ان السلالات انتخبت على اساس الدراسات التي أجريت خارج الجسم وهذا قد يكون غير مقبولا وان الانتخاب السليم يجب ان يبنى على دراسات داخل الجسم إضافة الى الفعاليات خارج الجسم فمثلا بعض المستحضرات التجارية المطروحة في الأسواق والتي تستعمل في علاج أمراض المهبل تحوي اما *Lb. acidophilus*او *Lb. casei* ذات الصفات الملائمة للغرض المطلوب ولكن يوجد افضل منها .

كما ان المواد المساعدة في تحضير الوصفة الطبية يجب ان تكون مدروسة بدقة وذلك لان بعض السلالات او معظمها قد لا تكون ملائمة للعمليات التصنيعية .

وعلى العموم فمن ضمن المواصفات للسلالات المنتخبة ان تكون صفاتها خارج الجسم الحي ذا كفاءة عالية للالتصاق للخلايا الطلائية لتتداخل مع مواقع التصاق الممرضات ، وان تكون ذو كفاءة عالية في انتاج بيروكسيد الهيدروجين لأنه من المواد الفعالة ضد البكتريا المسببة لالتهابات المهبل والتي يكون اغلبها أحياء لا هوائية ، وان تكون من الاحياء المنتجة لمواد قاتلة للممرضات ومواصفات اخرى .

وبعد اختيار السلالات المناسبة وجب العناية بالمواد التي ستخلط معها وذلك للحفاظ على مواصفاتها الجيدة وعيوشيتها ، وبصورة عامة تستعمل المواد التقليدية المستعملة في المستحضرات المهبلية التجارية او الأدوية التقليدية ولكن لإنجاح هذه الصناعة وجب اضافة المواد الصيدلانية التي تؤدي الى تقليل الشحنات السطحية السالبة على سطح البكتريا لزيادة كفاءة التصاقها كما مر ذكره انفا ، وفي أكثر المستحضرات تستعمل مواد ذائبة في الماء وهي Glycerinated gelatin او مكوثرات الكلايكول Polyethylene glycol polymers التي تزيد من اطالة بقاء العصيات اللبنية حية .

كما يجب العناية في اختيار المواد التي تحافظ على بقاء الخلايا حية إثناء مدة الخزن ، وقد امكن الاحتفاظ ببعض المستحضرات بشكل جيد لمدة ثمانية عشر شهرا والاختلاف في مدة البقاء بين السلالات قد يعود الى اختلاف نسب الحوامض الدهنية في الجزء ألدهني للأغشية الخلوية .

وفي مجال المحافظة على العيوشية فان هناك العديد من المواد التي تساعد في ذلك واستعملت في تحضير اقراص او تحاميل مهبلية ومنها :

1 - الحليب الفرز Skim milk الذي يشجع بقاء الخلايا حية تحت ظروف التبريد أي يكون Cryoprotective agent وليس بسبب تزويده بالمواد الغذائية وإنما لتحسين الظروف الفيزيائية الحامية للبكتريا وتزداد كفائتة عند استعماله مع مستخلص الخميرة ويكون بمثابة مواد حافظة .

-2 اللاكتوز والسكروز وهذه تضفي الحماية نتيجة لوجود خمس مجاميع هيدروكسيل (OH^-) في الجزئية الواحدة والتي تزود الخلايا بالحماية ضد الجذور الحرة ، وتكون حامية للخلايا تحت ظروف التبريد وذلك لسعة (Capacity) ارتباطها بالماء ومنع تكون البلورات الثلجية .

-3 الكحولات المتعددة Polyols والحوامض الأمنية وبعض مكونات الوسط يمكن تعطي للخلايا حماية من البرودة وذلك لان تخزين المستحضرات الحاوية على الخلايا الحية يتم تحت درجة 4 - 8 ْم عادة .

-4 المستحلبات Emulsifiers ويستعمل Tween 80 مع العصيات اللبنية فهو يعد من عوامل النمو لها بالإضافة الى تأثيرات أخرى فعند تعرض الخلايا له ربما يؤدي الى تغير الحوامض الدهنية وهذه التغيرات تؤثر على تحمل الخلايا لظروف الاجهاد .

-5 مضادات الأكسدة ويستعمل حامض الاسكوربيك Ascorbic acid (Vit. C) لهذا الغرض إذ بتأثيره المضاد للأكسدة يحمي دهون الأغشية الخلوية ويؤثر بشكل فعال على بقاء الخلايا حية أثناء التجفيد وخزن المستحضرات بشكل جاف .

-6 مواد أخرى ويمكن استعمال مواد أخرى للحصول على مستحضرات ملائمة منها استعمال مواد دهنية مثل زبده الكاكاو او كليسيريدات ثلاثية صناعية ، أو استعمال أوكسيد السليكون Silicon oxide الغروي ، او استعمال الجلاتين والسترات ويمكن زيادة مدة صلاحية المستحضر بحسن الاختيار .

وتخلط الاحياء العلاجية بنسبة 1 الى 5 من المواد الداخلة في تركيبة الدواء فمثلا بعض الحبات المستحضرة والتي يبلغ وزنها 0.5 غرام تحتوي على 5×10^8 من وحدات تكوين المستعمرات / غرام .

ان المستحضرات المذكورة أعلاه والتي عند إدخالها الى المهبل حاملة الاحياء العلاجية يمكن ان تغير من فلورا القناة البولية ـ التناسلية وتشجع نمو العصيات على حساب الاحياء الممرضة .

وعلى العموم تعد المستحضرات المهبلية ناجحة إذا احتوت على ما يقارب 10^{9} خلية حية / لكل غرام . ويمكن للأحياء العلاجية المستعملة لإصابات المهبل ان تعطى عن طريق الفم وليس بالضرورة عن طريق المهبل .

ومن المستحضرات المسوقة Fermalac على شكل كبسولات مهبلية يحتوي على 10^{8} – 10^{9} خلية حية لكل كبسولة ويحتوي على سلالة من *Lb. rhamnosus* وسلالات أخرى ، وكذلك المستحضر بالاسم التجاري Lactonrm ، وهي تسوق في بعض بلدان أوربا وكندا منذ مدة ولم تظهر أي دراسات تعارض استعمالها او توضح تأثيرات جانبية سلبية .

الفصل التاسع

الاحياء العلاجية في عالم الحيوان

الاحياء العلاجية في عالم الحيوان

تستعمل الاحياء العلاجية في الحيوانات ذات الأهمية الاقتصادية ومنها الدواجن والحيوانات المجترة مثل الأبقار والأغنام التي تعد المصادر الرئيسة للحليب واللحوم .

الطيور :

في صناعة الدواجن يمكن ان تصاب الأفراخ الصغيرة بالبكتريا المرضية نظرا لان أمعائها معقمة وتكون الأفراخ بعيدة عن أمهاتها وقد لا تظهر عليها الاصابات ولكنها تكون مصدرا لإصابة الانسان بواسطة الغذاء . فالطيور تكون مجالا جيدا لاستعمار أمعائها بالسالمونيلا وبكتريا القولون وبذلك يكون فروج اللحم Boiler منفذا لتسرب السالمونيلا الى الأغذية ، ولكن عند تلقيح الطيور حديثة التفقيس بمكونات Caecal contents من طيور بالغة فان الاصابة تقل كثيرا .

وتساعد يكتريا حامض اللاكتيك كأحياء علاجية في عالم الدواجن بطرق واليات مختلفة التي تكون عاملة في الحيوانات الاخرى .

حيونات الحقل :

وأكثرها أهمية هي الأبقار ثم تأتي الأغنام بالدرجة الثانية . إن تركيبة فلورا الأمعاء وعمليات أيضها تؤثر بشكل كبير على أداء حيوانات الحقل وبطرق متعددة خاصة الصغار والمواليد التي تتعرض لكروب وإجهادات بيئية . فالفلورا الداخلية التي توجد بعد الولادة تتداخل مع وظائف الجهاز الهضمي والمناعي للجسم وفعالياته وقد تكون هذه التداخلات مفيدة او مضرة وفقا لنوع الفلورا الموجودة .

الأحياء من امعاء حيوانات الحقل

ومثلما ذكر أعلاه ان أهمها هي العجول والأبقار وتركيب الفلورا في الأمعاء يعتمد على المضيف والعوامل البيئية ، واكثر التجمعات الميكروبية توجد في Lumen وتكون ملتصقة بالغشاء أو المواد المخاطية للخلايا الطلائية أو مرتبطة بجزيئات العلف وقد تكون حرة في سائل الامعاء .

في الأعمار المبكرة لهذه الحيوانات تكون الظروف الفسلجية ملائمة للتطور الفلورا الميكروبية من نوع خاص ، وتأتي الأحياء الى المعدة الأولى من الهواء والأم وغيرها من المصادر ففي عمر ثلاثة ايام توجد البكتريا المحللة للسيليلوز والبكتريا المولدة للميثان وهذه بطبيعة الحال آتية من الأم ، ثم تتطور بعد عمر 1 – 3 أسابيع وتصبح مؤلفة من البكتريا المحللة للسيليلوز وهي ليست ذات أهمية لأغلب الحيوانات في هذا العمر ، ولكن تظهر البكتريا المخمرة للاكتات وبكتريا القولون ، وبعد 9-13 اسبوع تقل البكتريا المخمرة للاكتات وتصبح فلورا الكرش Rumenمشابهة الحيوانات البالغة .

وتقل البكتريا المحللة للسيليلوز في العجول الرضيعة التي تتغذى على الحليب مقارنة بالعجول التي تتغذى على علف جاف . وعند فطم الحيوانات يؤدي ذلك الى ظهور الأبتدائيات Protozoa في الكرش ويتطور وجودها بتقدم العمر .

وفي الحيوانات غير المجترة والتي تتغذى صغارها على الحليب فان فلورا الامعاء الأولى تكون مكونة من بكتريا حامض اللاكتيك في كرشها وتكون ذات تأثير كبير على هضم العلف . وذلك لان منتجات الايض لبعض الاحياء الموجودة في الكرش قد يكون لها تاثير مشابه لتاثير الاحياء العلاجية في العمر المبكر .

ان الاحياء في الكرش لا تماثل ما موجود في الامعاء الدقيقة والغليظة وتتأثر بالغذاء والعمر وقد عزلت البكتريا الملتصقة بجدران الامعاء بمعدل 10^4- 10^7 / سم^2 وتتراوح اعداد الاحياء مثل العصيات البنية في الامعاء الدقيقة 10^6- 10^7 عصية / غم من محتوى الامعاء اما في الامعاء الغليظة فتصل الى 10^8- 10^9 . اما بكتريا القولون فتصل اعدادها الى 10^5- 10^7 في الامعاء الدقيقة وترتفع الى 10^8- 10^9 في الامعاء الغليظة.

تاثيرات الاحياء العلاجية في الحيوانات

في الحيوانات السليمة والبالغة فان كل جزء من الامعاء يستوطن بفلورا معينة التي تتطبع للعيش ضمن علاقة التعايش Symbiosis بحيث يستفيد الطرفان والحيوانات حساسة جدا لحصول عدم التوازن في فلورا الامعاء مما يؤدي الى عدم كفاءة الهضم وامتصاص المغذيات وبالتالي التدهور في النمو ،لذلك فان غذاءها يدعم بالمضادات الحيوية التي أثبتت جدارة في تقليل الإصابات بالإسهال وتشجيع النمو . ولكن اضافة المضادات الحيوية يمكن ان يؤدي الى نشوء سلالات مرضية مقاومة لها وبالتالي تقل كفاءة المضادات . كما ان إضافتها يؤدي الى وجودها في الاغذية بتراكيز واطئة مؤدية الى خطورة حدوث المقاومة المتداخلة Cross resistance مع ممرضات الانسان او مؤدية الى حصول الحساسية ولهذه الأسباب كان هناك اهتماما كبيرا في استبدال المضادات الحيوية بمضافات غذائية طبيعية مثل الاحياء العلاجية .

والعاملون في مجال الطب البيطري يعرفون Probiotics على انها أحياء من الفلورا الداخلية Indigenous flora او أنها Non- antibiotic agents التي تودي الى تقليل أعداد الاحياء المسببة لاصابات الحيوان وخاصة الامعاء والتي تحسن من مدى الاستفادة من الغذاء والحصول على بيئة جيدة في القناة الهضمية .

ولذلك فان الاحياء العلاجية وخاصة بكتريا حامض اللاكتيك تساعد الحيوانات في هضم المواد المعقدة مثلا المواد الاكثر تعقيدا من اللاكتوز كالنشا بواسطة الانزيمات المحللة له Amylotic

enzymes لانتاج المالتوز والمالتوز الثلاثي Maltotriose وبعض الكلوكوز من جزء النشا Amylopectin .

كما ان لها القابلية على تحليل الكلوكان Glucan وهذه تكون مفيدة جدا في الحيوانات التي تتغذى على الشعير والشوفان (Oat) وذلك لان أنزيمات المضيف لا تتحلل β-D-glucan ، وتؤثر الاحياء العلاجية على إنزيمات الخلايا في Brush border فقد وجد زيادة في الإنزيمات المنتجة منها مثل الأنزيمات المحللة للاكتوز والسكروز ووجد ان الاحياء العلاجية تقلل من انتاج مركبات النتروجين المؤذية ، فاعطاء البكتريا *Lb. acidophilus* في الحليب المخمر أدى الى تقليل الأمينات في الامعاء مقارنة مع حيوانات السيطرة التي تناولت حليب عادي إضافة الى موقع انتاج الأمينات الى الأعور Caecum في الحيوانات المعاملة وذلك ربما بإحباطها للـ *E. coli* التي هي أكثر البكتريات إنتاجا للأمينات .

كما سجل انخفاضا كبيرا في انتاج الأمينات الحرة عند أعطاء الحيوانات مركبات Amine-glucuronides , Azo compounds , Aromatic nitro-compounds compounds .

والذي كان مرافقا لانخفاض الأنزيمات المولدة للسرطان مثل Nitroreductase وAzoreductase و β-glucuronidase .

و في الحيوانات المجترة البالغة يعتمد هضم المواد اللبنية التي تشكل الأساس في مكونات الغذاء على الفعاليات التخمرية للبكتريا الموجودة في الكرش ،فالبكتريا بالإضافة الى تأثيرها المساعد في الهضم فأنها تنتج بعض المواد والتي تؤثر في امتصاص او استهلاك نواتج الايض . إضافة الى تحسين جوانب أخرى من فعاليات الحيوانات والتي تؤدي الى حسن الأداء .

الأسس المستعملة في اختيار الاحياء العلاجية في الحيوانات

وهذه الأسس تكاد ان تكون مشابهة للأسس المستعملة في الاختيار للاستعمال في الانسان ولو انها في بعض الاحيان تكون اقل تقيدا ومنها :

1- ان تكون الاحياء متحملة للحامض وذلك يساعدها في عبور محيط المعدة ألحامضي وعبور الاثنى عشري .

2- متحملة لمكونات الصفراء الذي يساعدها في عبور الجزء العلوي من الامعاء الدقيقة .

3- منتجة لمواد قاتلة للميكروبات كي تتمكن من المنافسة مع الاحياء المرضية .

4- لها القابلية للالتصاق للخلايا الطلائية المبطنة للأمعاء لتستطيع استعمار المنطقة والتنافس مع الاحياء المرضية على مواقع الالتصاق .

5- متحملة للحرارة لتقاوم عمليات إعداد العلف .

6- مقاومة لمضادات الميكروبات التي يمكن ان تضاف الى العلف الذي تدعمه.

آليات تأثير الاحياء العلاجية في الحيوانات

تتشابه هذه الآليات في الأطر العامة التي ذكرت بالنسبة للإنسان ومنها :

1- التضاد مع الاحياء غير المرغوب فيها : ويكون ذلك بإنتاج الحوامض العضوية التي تؤدي الى خفض الرقم الهيدروجيني في محتوى الامعاء التي تكون اكثر وضوحا في معدة الحيوانات الصغيرة ، مثل انتاج حامض اللاكتيك والخليك الذي ينتج من سلالات متباينة التخمر ولها تأثير فعال في القضاء على الاحياء المرضية .

وكذلك فان انتاج بيروكسيد الهيدروجين من قبل العصيات اللبنية له تأثير قاتل على العديد من الاحياء اللاهوائية مثل الكلوستريديا والسالمونيلا .

كما ان العديد من الاحياء العلاجية وخاصة بكتريا حامض اللاكتيك تنتج مضادات للميكروبات ذات الوزن الجزيئي العالي كالبكتريوسينات مثل Acidolin، Acidophilin والنايسين إضافة الى انتاج مواد قاتلة واطئة الوزن الجزيئي مثل Reuterin .

ولكن هذه المواد تعمل خارج الأنظمة الحية وليس من المؤكد إنها تعمل في داخل الامعاء ، ولذلك يعتقد الكثير من العاملين في مجال الطب البيطري ان التأثير الأكبر يعود الى توليد الحوامض وبيروكسيد الهيدروجين . وتستعمل سلالات من بكتريا حامض اللاكتيك في تقليل الاسهالات في الحيوانات حديثة الولادة الناتجة عن *E. coli* إذ تنخفض أعدادها الى حد كبير عند استعمال الاحياء العلاجية . وكذلك تستعمل *Lb. rhamnosus* (DR20) في حماية الحيوانات من السلالة الخطرة من *E. coli* وهيH7: 0157 .

2- الالتصاق : عملية الالتصاق تساعد في طرد الاحياء المرضية فبكتريا حامض اللاكتيك تستطيع استعمار القناة المعوية وذلك بشغلها وارتباطها الى المستلمات على الخلايا الطلائية المبطنة وبذا تؤدي الى طرد البكتريا الأخرى ، ويمكن ان تقوم بهذه المهمة مشتقات الجدار الخلوي دون الخلايا الكاملة .

فالبكتريا السالبة لصبغة كرام مثل *E. coli* تلتصق الى الخلايا المستهدفة بواسطة تراكيب بروتينية هي الخمل Pili ، في حين ان التصاق العصيات اللبنية يكون بمواد خارجية او سطحية تحوي على السكريات المكوثرة بشكل أساسي وربما تدخلت بعض البروتينات والدهون وكذلك المركب الخارجي LAT . وللمركب الأخير أهمية في عملية الالتصاق فهو مكوثر لفوسفات الكليسرول Glycerophosphate polymer يرتبط تساهميا للدهون السكرية في الجدار التي تحوي على مناطق كارهة للماء وأخرى محبة للماء ، وهذه المناطق يمكن ان ترتبط على سطوح الخلايا الطلائية . وقد وجد بالفحص باستعمال المجهر الالكتروني ان مناطق الالتصاق بين البكتريا والخلايا

الطلائيـة تكـون غنيـة بـالمواد الحامـضية الغنيـة الكاربوهيـدرات . ويـساهم LAT فـي التـصاق المسبحيات المكورة ايضا الى خلايا اللبائن . وفي بعض الحيوانات مثل الخنازير وجد ان العصيات اللبنية تكون كميات من السكريات المكوثرة العلبية وبعض المواد الأخرى ذات كراهية عالية للماء وتتأثر بـالحرارة والإنزيمـات الهاضـمة للبروتينـات وتكون مهمـة جدا فـي عمليـات التـصاق البكتريـا للمضيف .

ولذلك فان السلالات تختلف في قابليتها علـى الالتـصاق وكذلك الوسـائل المستعملة للالتـصاق ، وقد وجدت آليات أخرى غير المذكورة أعلاه للالتصاق مثل مشاركة Sialic acid الذي عد المكون الرئيس في التصاق البكتريا غير المرضية للأمعاء .

3- التاثير على طبيعة القناة : للأحياء العلاجية تـأثير كبير علـى تركيب ومظهر القنـاة الهضمية . فالملاحظ ان القناة الهضمية للحيوانات مثل الأبقار و المجترات الأخرى تكون جدرانها في منطقة الامعاء مرتبة بشكل خاص ، والطبقة المخاطية ذات الطيات الكثيرة مغطاة بنتوءات إصبعية الشكل وهي الزغابات التي تكون مغطاة بدورها بخلايا معويـة قـادرة علـى الامتـصاص وتوجـد معهـا خلايـا تفرز المواد المخاطيـة . وبين الزغابـات توجد منـاطق او أخاديد Lieberkühn التـي تتكـاثر فيهـا الخلايـا الطلائيـة لتمتد الـى الفـراغ المعوي Lumina propria ، وأثنـاء هجـرة الخلايـا فـي هذه الأخاديد الـى قمم الزغابـات تتمـايز وتـنضج ويـزداد إنتاجهـا للإنزيمـات الهاضـمة . ووجـود الاحيـاء المجهرية يؤثر في الشكل الذي تتخذه الزغابات وتزيـد ايضا مـن معدل تجديدها ، ويعتقد أن التـأثير المحفز يعود الى البيوتيرات التي لها تأثير كبير على الخلايا كما مر ذكره سـابقا فـالبيوتيرات تكون مفضلة على الكلوكوز في بعض الحيوانات كمصدر طاقة في الخلايا القولون Colonocytes .

وقد وجد إن احتـواء الغذاء علـى المضادات البكتريـة والتـي تـؤدي الـى قلـة فلـورا القنـاة الهـضمية (Gut) يؤدي الى قلة كتلته الجدارية لها ويشجع عملية امتصاص الغذاء أي تزيد من كفاءة وظيفته .

4 - التأثر على الجهاز المناعي : للأحياء العلاجية تأثير كبير على الجهاز المناعي في الحيوان كما هـو الحـال فـي الإنـسان . فالأمعـاء تحتـوي علـى GALT، وتوجـد مباشـرة تحـت الطبقـات الخلويـة الخارجيـة مـن الطبقـة المخاطيـة وبـذلك تـشكل أول خـط دفـاعي متخصص تجـاه مستـضدات البكتريـا الـضارة والمستـضدات الأخـرى فـي الغـذاء . وتنـتج GALT الكلوبيولينـات المناعيـة وبـشكل رئيـسي sIgG , sIgA وتختلط هذه بالمخاط لتكون معقدات لها آلية متخصصة بالحماية.

والخلايا اللمفاوية (وهي الخلايا البائيـة) المسئولة عن إفراز IgA تنشأ فـي جيوب بـاير وتقـوم بإنتـاج الأجـسام المـضادة الخاصـة بالمستـضدات الموجـودة . أمـا الخلايـا الطلائيـة فتقـوم بتخليـق الببيتيدات Secretory components التي تسهل ارتباط IgA الى المخاط وتنشره على سطح

الطبقة المخاطية ليكون طبقة وقائية . اما الخلايا الأبتلاعية الكبيرة والخلايا التائية السامة فتكون مسئولة عن المناعة في القناة الهضمية ، وتؤدي الاحياء العلاجية الى زيادة القابلية على الابتلاع

وتتداخل فلورا القناة الهضمية مع GALT بنمط مهم يحافظ على المضيف ويلاحظ إن الأجسام المضادة المفرزة هي التي تنظم استيطان الممرضات والتصاقها على الخلايا الطلائية ، ووجود البكتريا قرب المنطقة المغطاة بالأجسام المضادة تساهم في الأثر الدفاعي عن الجسم . والاحتمال من ان البكتريا الدفاعية تساهم ببعض المستضدات التي تحفز GALT للدفاع وهي بذلك تختلف عن المستضدات الاحياء المرضية التي يرفضها عادة الجهاز المناعي .

4- التأثير على الكولسترول : تستعمل الحيوانات عادة لدراسة تأثير الاحياء العلاجية على الكولسترول وقد وجد ان استعمال *Lb. acidophilus* المقاومة لوجود الصفراء قادرة على استهلاك الكولسترول في الخنازير اذ ان استعمال هذه السلالة أدى الى منع ارتفاع الكولسترول عند استعمال أغذية غنية بالكولسترول واستعمال البكتريا *Lb. rhamnosus* CRL1098 بمعدل 10^4 يوميا لمدة سبعة أيام منعت ارتفاع الكولسترول وغيرت من نسب LDL:HDL في حيوانات التجارب .

كما ان فك اقتران حوامض الصفراء بواسطة العصيات اللبنية قد يؤدي الى تثبيط عدد كبير من بكتريا الامعاء والتي توجد في الجزء السفلي من الامعاء الدقيقة والقولون . وتزداد فعالية انزيم BSH في الامعاء عند وجود العصيات اللبنية والبكتريا المنشطرة .

5- التأثير الإنزيمي : بالإضافة الى التأثير الأنزيمي على الكولسترول المذكور أعلاه فأن للأحياء العلاجية تأثيرات إنزيمية أخرى :

- التأثير على الأنزيمات العاملة في ايض المواد النتروجينية وبذلك تقلل من انتاج الأمونيا والأمينات السامة .
- التأثير على الإنزيمات التي تساعد في زيادة استهلاك اللاكتوز وذلك لاحتوائها على اللاكتيز والذي يكون مهما في المراحل الأولى من حياة الحيوانات الرضيعة .

وفي عوالم اخرى من عالم الحيوان تستعمل الاحياء العلاجية في حماية الاحياء في الزراعة المائية Aquacultures خاصة في مزارع تفقيس بيوض الأسماك وكذلك تربية الأسماك الصغيرة

استعمال الأحياء العلاجية مع المضادات الحيوية في الحيوانات

للوصول الى أفضل أداء لحيوانات الحقل يفضل أقران الاحياء العلاجية مع المضادات الحيوية في العلف . وذلك لان الفلورا الطبيعية للأمعاء تمنع الاحياء العلاجية وكذلك تمنع الاحياء المسرطنة من استيطان الامعاء ، وعليه فعندما يراد للاحياء العلاجية اداء دورها لابد من اضعاف الفلورا الطبيعية وذلك يكون باضافة المضادات الحيوية سوية مع أعداد كبيرة من

الاحياء العلاجية في العلف والذي بعد مدة سيؤدي الى خفض مستويات المضادات الحيوية في العلف او الاستغناء عنها .

الفصل العاشر

الاحياء العلاجية الاخرى

الموضوع | الصفحة

الاحياء العلاجية الأخرى

نصت معظم التعاريف التي وضعت للـ Probiotics على إنها أحياء مجهرية يمكن ان تضفي الفوائد الصحية على الجسم عند إعطائها بجرع ملائمة وقد قبلت منظمات الصحة العالمية WHO ومنظمة الصحة الأغذية والزراعة FAO هذا التعريف ونشرته في تعليماته التي مر ذكرها . وهذا يعني ان كل ميكروب يضفي فوائد صحية يمكن ان يستعمل ضمن مجموعة الاحياء العلاجية ولكن هذا المفهوم المستخلص يتعارض مع التشريعات الموضوعة التي سيأتي ذكرها لاحقا .

وقد حظيت بكتريا حامض اللاكتيك والأحياء القريبة او الملحقة بها مثل بكتريا المنشطرة وبكتريا حامض البروبيونيك بالقدر الأكبر من الاهتمام نظرا لكونها أمينة الاستعمال وأغلبها من الاحياء المقيمة في بعض مناطق جسم الانسان او الحيوان كما مر ذكره . ولكن الى جانب ذلك توجد أحياء علاجية تستعمل في عالم الحيوان بشكل اكبر من استعمالها الانسان وهي من مجاميع أخرى غير بكتريا حامض اللاكتيك ولكن تطبيقاتها اقل اتساعا من بكتريا حامض اللاكتيك .

جنس العصيات ***Bacillus***

ازداد البحث عن أحياء علاجية في الآونة الأخيرة لتكون بديلا عن المضادات الحيوية وهذه البدائل يجب ان تكون مؤثرة واقتصادية في عالم الحيوان أي استعمالها كمضادات للعلف . وقد وجدت بعض أنواع جنس العصيات طريقا للاستعمال كأحياء علاجية نظرا لمطابقتها بعض المواصفات المطلوبة في الاحياء العلاجية ومنها :

1- تشجيعها لنمو المضيف .

2- زيادة كفاءة تحويل العلف .

3- تثبيط الممرضات المعوية .

4- عدم ظهور أعراض سلبية على المضيف عند استعمالها .

وقد ذكر سابقا ان من المواصفات التي يعتمد عليها في انتخاب السلالات العلاجية هو تحملها للعمليات التصنيعية وكذلك ظروف الخزن وبالنسبة للحيوانات يجب أن تكون ملائمة لظروف إطعام الحيوانات في الحقل أي أنها يجب ان تتحمل الإجهادات المختلفة . وفي هذا المجال يعد جنس العصيات ملائما إذ انه يكون الابواغ إضافة الى ان الخلايا تعيش بدرجات حرارية اعتيادية وتتحمل الابواغ ظروف التجفيف مثل استعمال المجففات الرذاذية وبذلك يتم تجنب استعمال عملية التجفيد المكلفة . كما ان الابواغ الناتجة يسهل إعطائها مع المساحيق او

تخلط مع العلف دون استعمال السوائل او الهلام او غيرها من الوسائل التي تستعمل مع غيرها من البكتريا .

وفيما يلي عرض مبسط لبعض أنواع جنس العصيات المستعملة كأحياء علاجية :

***B. cereus* :** استعملت البكتريا ضمن مستحضرات علاجية تجارية سواء بشكل مفرد او مع غيرها من الاحياء ومنها المستحضر CenBiot المستعمل في البرازيل كمضاف علفي والسلالة المستعملة في المستحضر تلائم المتطلبات الموضوعة للأحياء العلاجية . وتكون D_{80} لابواغها حوالي 14 ساعة ، ولا تثبط بالتراكيز الواطئة من المضادات الحيوية التي تضاف الى العلف .

والبكتريا غير مضرة بالحيوانات مثل الفئران البالغة والرضيعة كما انها تثبط نمو *E. coli* و *Y. pseudotuberculosis* عند النمو المشترك بعد 24 ساعة .

والمستحضرات المعدة منها تشمل انواع اخرى مثل *B. clausii* , *B. pumilus* والمستحضرات المذكورة تستطيع أن تثبط عددا من الممرضات مثل *H. pylori* (كما في المستحضر Biosporin) و *Vibrio harveyi* وكذلك سلالة *E. coli* 078:K80

والبكتريا *B. cereus* قادرة على الاستعمار الامعاء وتحفيز الجهاز المناعي فهي تحفز انتاج سايتوكينات الالتهاب الاولية ، كما أنها تحفز الخلايا التائية المساعدة Th1 لإنتاج IFN γ- وتنتج مواد شبيهة بالبكتريوسينات ويفضل استعمالها على العصيات اللبنية لأنها تقاوم الجفاف .

والمستحضرات التجارية الاخرى التي تستعمل فيها البكتريا هو مستحضر Biosubtyl الذي يحوي على 10^{7} بوغ / غم الذي تخلط فيه *B. cereus* var *vietnami* مع *B. pumilus* اما المستحضر التجاري Bactisbtil فيحوي السلالة *B. cereus* IP5832 .

ان السلالة المستعملة في المستحضرات التجارية مصنفة على أساس المظاهر الخارجية لجنس العصيات والتفاعلات الكيموحيوية أي ان تصنيفها لم يخضع للدراسات معمقة . ولكن من صفاتها الملائمة تحملها لدرجات حرارية تزيد عن 50 ^{o}م اعتمادا على مدة التعريض للحرارة . ومقاومة للأرقام الهيدروجينية الواطئة فبعد تعريض البكتريا لرقم هيدروجيني واطئ (1) لمدة 24 ساعة أدى ذلك الى انخفاض 35 % .وكانت نتائج الدراسات التي أجريت داخل الجسم الحي وخارجه متطابقة الى حد بعيد ،إذ أنها كما ذكر أعلاه تثبط نمو *E. coli* خاصة المسببة للإسهال مثل *E. coli* K88ac وكذلك *E. coli* 0147(0147:K 89) ، فعند تنميتها مع هذه السلالات في وسط نمو مشترك ثبطت الأحياء بمستوى 67- 70% وهذه مطابقة لتجارب الحقل اذ لم يمكن عزل سلالة *E. coli* K88ac من الحيوانات التي أعطيت المستحضر

التجاري مقابل عزلها بنسبة 20 % من الحيوانات غير المعاملة . والسلالة المستعملة لا تحوي على البلازميدات لذلك يعتقد ان تأثيرها لا يكون معتمدا على البكتريوسينات .

ونظرا لمقاومتها للتراسايكلين والكانامايسين والكلورمفينول (10 مايكروغرام / مللتر) فهذا يتيح الفرصة امام استعمالها مع المضادات الحيوية في العلف وذلك يؤدي الى وجود تأثير تآزري ولكن هذا لا يحصل دائما وانما يكون ممكنا مع بعض المضادات الحيوية .

والبكتريا تتحمل حرارة 80 ° م دون حصول فقدان في عيوشيها اثناء التصنيع ولذلك فهي تعد مثالية كأحياء علاجية .

ومن جهة اخرى فأن بعض سلالات CenBiot لا تحمل صفات انتاج السم المعوي الحال للدم (Non-hemolytic enterotoxin) *Nhe C* في حين ان السلالات الاخرى تحمل *hb1A* , *hb1C* , *hb1D* التي تشفر للسم الحال للدم Hemolysin BL (Hb1) . كما ان البعض منها يحمل الجين *bceT* الذي يشفر للسم المعوي Enterotoxin T .

وكل السلالات التي اختبرت تؤدي الى تحلل الدم الجزئي في الأوساط الحاوية على دم الخرفان Sheep blood agar. كما إن اغلبها تنتج الأنزيم الحال لليسثين Lecithinase.

B. subtilis تستعمل بعض سلالاتها كمستحضرات علاجية مثل Enterogermina يحتوي على 10^8 بوغ / مللتر الذي يسوق في ايطاليا بكثرة وخاصة لمعالجة اضطرابات القناة الهضمية عقب استعمال المضادات الحيوية . والبكتريا غير المرضية تكون الابواغ توجد في التربة ، وجد انها تنشط الجهاز المناعي في العديد من حالات التي استعملت فيها ، فإعطائها أدى الى زيادة sIgA في إفرازات الامعاء داخل الجسم وكذلك تؤدي الى زيادة مماثلة في الدراسات خارج الجسم الحي .

والمستحضر Enterogermina يحوي على اربع سلالات من *B. subtilis* واصلها السلالة ATCC 9799 المقاومة للبنسلين فالبعض تفرز انزيم Penicillinase لتحليل البنسلينات ، كما انها تحمل مقاومة كروموسومية لعدد من المضادات الحيوية وهي مشتقة من السلالة الأم اعلاه ، ومن المضادات التي تقاومها اللنكومايسين والارثرومايسين والسيفالوسبورين . وسلالات اخرى تحمل المقاومة لمجموعة أخرى من المضادات مثل النيومايسين والكلورمفينكول والنوفوبايوسين والتتراسايكلين والستربتومايسين . وصنفت احدى السلالات مؤخرا على انها *B. clausii* .

ان ما ما ذكر أعلاه حول استعمال جنس العصيات كأحياء علاجية لا يزال محط تساؤل فقد حصلت حالات تجرثم عند استعمال المستحضر Enterogermina في ايطاليا لدى كبار السن وكذلك تعرضت الكثير من المستحضرات التجارية الى دراسات جزيئية مفصلة لإعادة تقييم

إمكانية استعمالها اذ ان استعمالها كان بالاعتماد على الخطوط العريضة للمواصفات ، اضافة الى ما ذكر من صفاتها لحمل المقاومة لبعض المضادات الحيوية وإنتاج السموم يضعها موضع تساؤل حول أمكانية استعمالها .

B. licheniformis : وهي من جنس العصيات التي تستعمل كاحياء علاجية في عالم الحيوان .

احيـــــــاء اخرى

Rhodobacter بكتريا تستعمل كأحياء علاجية ولكنها ضمن دراسات مشتتة وغير مبنية على أسس واسعة من الأمان والسلامة لاستعمالها.

Streptococcus gordonii *:* أحياء متعايشة في فم الانسان استعملت في مجال الهندسة الوراثية لملائمتها مثل تحميلها بـ TTFC سم الكزاز وأعطيت للفئران مما أدى الى استثارة الاستجابة المناعية .

E. coli : وهي لا تعد من الاحياء العلاجية لان العديد من سلالاتها مرضية ولكن السلالة *E. coli* 83972 استعملت بكفاءة لمنع إصابات المثانة في مرضى إصابات الحبل ألشوكي ، إذ تزرع البكتريا في مثانتهم وقد وجد أنها تقلل من معدل الإصابات وتكرارها المرافقة للأعراض بمعدل يزيد على 60 مرة مقارنة بحالة عدم استعمالها .

Oxalobacter :

احد البكتريات التي تعد من الاحياء العلاجية تستعمل للتخلص من الاوكزالات واهمها *Ox. formigenes* . وتنتشر الاوكزالات في العديد من الاغذية ولا يمكن تجنبها ، والتي تؤدي عند بعض الأشخاص الى حالة ارتفاع الاوكزالات Hyperoxaluria وبالتالي تؤدي الى تكوين حصى الكلى من اوكزالات الكالسيوم .

البكتريا لاهوائية تقطن أمعاء الإنسان وبعض الحيوانات وتكون حساسة جدا للمضادات الحيوية والأدوية . وتعود أهمية البكتريا الى قابليتها على استهلاك الاوكزالات مصدرا وحيدا للكاربون وتعطى عن طريق الفم ، وإعطائها لمتبرعين ادى الى انخفاض الاوكزالات في البول بعد تناولهم غذاء غني بالاوكزالات وأمكن عزل البكتريا من الغائط فيما بعد .

الخمــــائر

وتستعمل الخمائر كأحياء علاجية ولعل اهم جنس فيها اكتسب شهرة ففي هذا المجال هو *Saccharomyces* .

Sc. cerevisiae : تستعمل الخميرة في حالات قليلة كأحياء علاجية ، خاصة في عالم الحيوان مثل الدواجن إذ ان إعطاءها مع العلف يؤدي الى زيادة انتاج البيض وكذلك زيادة وزن البيضة وزيادة الوزن النوعي للبيض .

ولكن مشتقاتها هي الأكثر استعمالا (وهذا خارج نطاق موضوع الكتاب) ويمكن ذكر بعض من تلك الاستعمالات وهي استعمال الكلوكان الموجود في جدران الخلايا في معالجة بعض السرطانات ، وتسوق منتجات منه لهذا الغرض ، وذلك لان كلوكان الخميرة له تركيب متفرع ومناسب لإثارة الاستجابة المناعية مقارنة بغيره من المصادر مثل كلوكان الحبوب كالحنطة والشعير والشوفان ، وقد استعمل بنجاح في دراسات أجريت في جامعة بغداد لعلاج حب الشباب Acne إذ انه أعطى مؤشرات مناعية ايجابية كما انه ساعد على شفاء العديد من الإصابات المتوسطة والشديدة لدى الشباب المتطوعين .

Sc. boulardii *:* خميرة غير ممرضة عزلت من نوع من الفواكه ويعتقد أنها أحدى سلالات خميرة الخبز *Sc. cerevisiae* . استعملت كأحياء علاجية لمعالجة اضطرابات الجهاز الهضمي خاصة مثل الإسهال وخاصة الإسهال الذي يعقب استعمال المضادات الحيوية التي عادة يكون السبب فيها البكتريا الانتهازية الموجودة في الامعاء *Clostridium difficile* . وهي حالة خطيرة اذ يصاب حوالي 2700 شخص من مجموع 100000 شخص وخاصة الاطفال ونزلاء المستشفيات ، والبكتريا الأخيرة تفرز السموم A و B وهذه تؤدي الى الإضرار بالطبقة المخاطية للقولون ، وقد وجد ان الخميرة يمكن ان توقف تاثير السموم بفلقها للوحدة A بواسطة بروتيز سيريني Serine protease ذو وزن جزئيي 54 دالتون .

استعملت الخميرة ايضا في علاج إسهال المسافرين بكثرة . والدراسات التي أجريت أسفرت عن ان للخميرة تأثير مضاد للكوليرا وإصابات الطفيليات المعوية وغيرها من الأمراض التي تصيب الجهاز الهضمي .

كما ان لإفرازات الخميرة تأثيرات قاتلة للعديد من الاحياء الملوثة للجروح والحروق والمقاومة للعديد من المضادات الحيوية قيد الاستعمال . ففي دراسات أجريت في جامعة بغداد وبعض مراكز البحث العلمية في أوائل العقد الحالي وجد ان لها تاثيرا كبيرا خارج الجسم الحي على سلالات من *Pseudomonas* المقاومة لست او سبع من المضادات الحيوية وكذلك اثرت بشكل كبير على سلالات من بكتريا *Staph. aureus* المعزولة من الحروق والجروح الملوثة .

ووجد ان الوسط الذي تنمو فيه الخميرة يحتوي على مواد تشجع الاستجابة المناعية اذ قيس تأثيرها على معامل البلعمة او ما يسمى بمنسب البلعمة Phagocytic Index للخلايا الأبتلاعية الكبيرة المعزولة من الدم المحيطي للانسان .

وهذه النتائج تشير الى ان للخميرة إمكانيات عدة في التأثير على الكائنات المحيطة اما بشكل مباشر او بشكل غير مباشر . وقد يكون التاثير القاتل لهذه الخميرة ناتجا عن وجود جزيئات من Virus -like DNA تستوطن الخلايا والتي يمكن ان تفقد من الخلية كما أشارت نتائج عمليات الزرع المتكرر الى فقدان القابلية التضادية مع الأحياء الأخرى .

والخميرة تسوق بكثرة في بلدان أوربا ومنها فرنسا التي تنتج شركاتها عدة منتجات تحت مسميات تجارية مختلفة استعمل بعضها في معالجة اسهال الأطفال في العراق في بداية التسعينات . ومما يشجع استعمال الخميرة انها تتحمل الاجهادات والظروف المستعملة اثناء اعداد المستحضرات الطبية فهي تسوق على شكل كبسولات او مسحوق للخلايا مجفدة . وتأثرها بعملية التجميد قليل وكذلك بعملية التجفيف التي تعقب التجميد أثناء إعداد المستحضر المجفد .

ويمكن ان تخزن لمدة ثلاثة أشهر اوأكثر دون انخفاض في أعدادها الحية دورة لوغارتيمية كاملة سواء بدرجة حرارة الغرفة او الثلاجة ولو ان الأخيرة وفرت حماية اكبر .

الفطريات كأحياء علاجية :

تشارك الفطريات كأحياء علاجية بقدر ضئيل من المساهمة ، واهم الفطريات المستعملة والموثقة نتائجها واستعمالها هو الفطر *Asperigllus oryzae* وبعض سلالات من الفطر *Asp. niger* .

وفي صناعة الدواجن تصاب الأفراخ التي تفقس بعيدا عن أمهاتها بالبكتريا المرضية لان أمعائها تكون معقمة . وأصابتها تنعكس بشكل كبير على الانسان بتوليد الأمراض التي تنتج من تناول لحومها (Food-borne diseases) . وأكثر الملوثات خطورة هي *Salmonella* إذ تلوث بشكل كبير الامعاء وخاصة منطقة الاعور التي تكون فيها الفعاليات البكتريا على أشدها . ولأجل انتاج منتجات دواجن خالية من السالمونيلا طرحت فكرة الابعاد التام Complete exclusion (CE) اوائل سبعينيات القرن الماضي وتم تطبيق الفكرة باستعمال الاحياء العلاجية وفي مقدمتها بكتريا حامض اللاكتيك في كافة شؤون ادارة تربية الدواجن . وقد استعملت بكتريا *Lb. reuteri* في حقول دواجن كلية الطب البيطري / جامعة بغداد في التقليل من الإصابات التنفسية ببكتريا *E. coli* وذلك باضافة بكتريا حامض اللاكتيك الى الفرشات تحت الدجاج مما يؤدي الى قطع دورة الإصابة . وتضاف الاحياء العلاجية ايضا

لتدعم العلف للتاثير على التوازن الطبيعي لفلورا الامعاء ، كما ان اعطاء الاحياء العلاجية يؤدي الى مساعدة الأفراخ للعيش بشكل مشابه للأفراخ الطبيعية .

ومن جهة اخرى فان عالم الحيوان يعج باستعمال المضادات الحيوية المختلفة ولكن بدأت سلبيات استعمال المضادات الحيوية بالظهور بشكل واضح لذلك كان التحول لاستعمال الاحياء العلاجية هو البديل . وقد استعمل عددا من الاحياء العلاجية في عالم الدواجن خاصة *Asp. oryzae* وبعض سلالات *Asp. niger* وبعض سلالات خميرة الخبز *Sc. cerevisiae* وخميرة *Sc. boulardii* . والحقيقة ان استعمال الفطر *Asp . oryzae* في عالم الحيوان في تزايد .

الآليات التي يعمل بها الفطر *Asp. oryzae* :

يعمل الفطر كمواد اساس لنمو بكتريا حامض اللاكتيك مثل *Lactobacillus* في النظام المعوي وبذلك تقل اعداد السالمونيلا و *E. coli* وهذا ما تم ملاحظته في العديد من الدراسات التجريبية الحقلية . وعليه فان الفطر يلعب دورا غير مباشر في تغيير فلورا الامعاء ، كما انه قد يكون له دورا تآزري مع الاحياء الداخلية في الامعاء .

والفطر يزيد من كفاءة تحويل العلف ويغير من تايض المواد الغذائية نظرا لاحتوائه على العديد من الانزيمات المحللة للنشا والبروتيزات والتي تؤثر على عملية هضم المواد الغذائية .

كما ان للفطر تاثير خافض للكولسترول في الحيوانات التي أطعمت الفطر بنسبة 0.1 % من العلف خاصة في فروج اللحم Broiler ، وهذه القابلية قد تعود الى وجود بعض المركبات في الفطر التي تثبط تخليق الكولسترول والتي تم قياسها بقياس كمية وفعالية الانزيم HMG.CoA reductase الذي يعمل في تكثيف المركبات ثنائية الكاربون في الخطوة الاولى من تخليق الكولسترول .

واستعمال الفطر في الدواجن يؤثر على تقليل رطوبة الغائط وهذه مهمة في تصنيع الدواجن .

ومجمل الدراسات التي اجريت في صناعة الدواجن التي تعد الرائدة في استعمال الفطر *Asp. oryzae* اشارت الى ان اعطاء الفطر لفروج اللحم قد ادى الى زيادة تناول العلف ، وزيادة الوزن المكتسب بتاثيره على عمليات الهضم كما انه قلل من انتاج الامونيا ، وخفض الكولسترول في مصل الدم ، ويؤدي الى تحوير فلورا الامعاء الى الجوانب الايجابية .

ومن المستحضرات التجارية الرئيسة الحاوية على *Asp. oryzae* والمستعمل على نطاق واسع هو Fermacto والمستحضر يحتوي على الفطر اضافة الى سلالة من *Asp. niger* . الذي ادى استعماله مع الحامض الاميني الميثايونين في الدجاج البياض الى إعطاء بيض كبير الحجم جدا .

الفصل الحادي عشر

المنتجات العلاجية

المنتجات العلاجية

ازدادت مساحة المنتجات الحاوية على الاحياء العلاجية بشكل كبير اذ انه في عام 2001 وصلت الى 10% من المنتجات الأوربية. وازدياد الطلب كان على الألبان بصورة خاصة ويتضح ذلك من زيادة عدد انواع المنتجات وأفضل المنتجات التي تحوي على الاحياء العلاجية هي الاغذية ، لذلك أصبح مفهوم الأغذية الفعالة Functional foods والأغذية العلاجية مثل Pharma foods و Therapeutic foods او Nutraceuticals وغيرها من المسميات متداولا .

والحقيقة ان الحليب والمنتجات المتخمرة منه تمثل الوسيلة الغذائية الملائمة او النظام الغذائي الملائم لتناول الأغذية العلاجية ، اضافة الى اللبن او الجبن العلاجي او غيرها التي تمثل البيئة الملائمة للحفاظ على الخلايا العلاجية . وبدأت المنتجات الحاوية على الاحياء العلاجية تطرح بكميات كبيرة تحت مسميات كثيرة مثل المشروبات الحيوية Biodrinks والحليب الحيوي Biomilks وغيرها مما سيأتي ذكره لاحقا .

وفكرة المنتجات العلاجية ليست جديدة ، ففي اليابان يسوق المنتوج Yakult منذ ثلاثينات القرن المنصرم ويحوي على السلالة *Lb. casei* Shirota (المعزولة من الانسان) ، هذا المنتج ينتج على شكل حليب متخمر يسوق بملايين القناني يوميا ويستخدمه اكثر من عشرين مليون شخص في اليوم . وفي الدول الأوربية يسوق منتوج (LC_1) الحاوي على *Lb. johnsonii* LJ1 بشكل كبير كمنشط للجهاز المناعي وأسواقه في اتساع كبير .

أما في دول الشرق فقد بدت بوادر استعمال هذه الاغذية خاصة للأطفال في بعض دول الخليج العربي . وإن كانت المنتجات اللبنية العامة هي الأوسع انتشارا في الدول العربية منذ القدم .

مواصفات الأغذية العلاجية

لعل اهم ميزة والتي يتم التأكيد عليها باستمرار هو انتاج منتجات تحوي على أعداد كبيرة من الخلايا الحية . والحد الأدنى من عدد الخلايا الحية الواجب توفرها في الغذاء يعتمد على كمية التناول اليومي ، فاستعمال 10^9 وحدة تكوين مستعمرات قد يكون الحد الأدنى في بعض الاحيان لإظهار التأثير الصحي الإيجابي ، وعليه فإن استعمال 100 غرام / يوم يعني الحاجة الى احتواء الغذاء على 10^7 وحدة تكوين المستعمرات / غم او مللتر ، ومثل هذه التوصيات هي الموصى بها من قبل الجهات المختصة والمعمول بها في بعض البلدان التي تستعمل المنتجات العلاجية مثل اليابان التي تتصدر هذه الدول . ولكن تحديد الحد الأدنى يجب ان يعتمد على ملاحظة الجوانب الصحية وليست الكلفة .

وقد اشير في فصول سابقة ان بعض الجوانب الصحية الايجابية يمكن ان تنتج من استعمال خلايا غير حية ومثل هذه الحالة تجد لها صدى جيد لتطوير المنتجات وهي الأكثر تفضيلا في الدول النامية حيث من الصعوبة توفير وسائل تداول وحفظ المنتج .

الظروف المؤثرة على الاحياء العلاجية اثناء التصنيع والانتاج

إن اهم الاغذية لانتاج المنتجات العلاجية هي الألبان والتي يطلق عليها الألبان العلاجية Probiotic yoghurt أو Yoghurt-type fermented milks وذلك لأن هذه الأنظمة الغذائية تحافظ على الخلايا لأسباب كثيرة مر ذكر بعضها سابقا . والخيار الأفضل من بينها هو اللبن أو الحليب المتخمر أو الحليب غير المتخمر الحاوي على الاحياء العلاجية مثل الحليب الأسيدوفيلي الحلو Sweet acidophilus milk الذي يسوق على نطاق واسع في الدول الغربية ويحوي على سلالات معينة من بكتريا *Lb. acidophilus* والمستعمل منذ عشرات السنين . وقد امتدت المحاولات لإنتاج الجبن العلاجي Probiotic cheese وجبن الشدر Cheddar cheese من المنتجات الملائمة للحفاظ على الخلايا العلاجية فبعد تعتيقه لمدة 15 شهر وجد انه حافظ على الخلايا حية بشكل أفضل من الألبان المجمدة وبذلك فهو يسهل وصول الاحياء العلاجية الى امعاء الانسان .

والمثلجات العلاجية Probiotic ice cream تعد من الوسائل الجيدة لتحضير المنتجات العلاجية وفي مجال تصنيع المثلجات العلاجية كانت هناك تجربة رائدة لكلية الزراعة جامعة بغداد في هذا المجال .

وتوجد العديد من الظروف او العوامل التي تؤثر على الاحياء العلاجية في المنتجات المذكورة اعلاه وغيرها . فمن المعروف ان الاحياء العلاجية هي ليست احياء البان وانما مصدرها الاساسي هو القناة المعوية ، وعليه فإن الحليب ومنتجاته قد لا توقر البيئة الملائمة لبقاء معظم الاحياء العلاجية ومن هذه العوامل :

-1 **المواد المغذية** في الحليب لا تلاءم العديد من سلالات البكتريا المنشطرة التي لا تنمو بشكل جيد في الحليب المستعمل (وهو حليب الأبقار عادة) .

-2 **تأثير الحموضة** وقد سبق وأن تم تبيان ان بكتريا حامض اللاكتيك والبكتريا المنشطرة التي تستعمل بشكل رئيس كأحياء علاجية تنتج الحوامض مثل حامض اللاكتيك والخليك والكحول الاثيلي في المسارات التي تم إيضاحها . والحوامض الضعيفة التي تنتجها تخرج من الخلية الى الوسط المحيط ، فيلاحظ ان الحليب المتخمر يحوي على 0.5- 1.5 % من حامض اللاكتيك (عند تخميره ببوادئ اللبن التقليدية) فوجود 0.5 % يعني انخفاض الرقم الهيدروجيني الى 4.5 وزيادته الى 1.5 % تخفض الرقم الهيدروجيني الى 3.5 واللبن المثالي يكون رقمه الهيدروجيني 4.5 ، وتكون هذه الكميات معتمدة على السلالة المستعملة وطول مدة التخمر.

ويحدث خفض للرقم الهيدروجيني أثناء عمليات الخزن بدرجة حرارة الثلاجة أي حصول تحميض متأخر Post-acidification. ومثل هذه الأرقام الهيدروجينية تؤثر على عيوشية الاحياء العلاجية (يراجع فصل الايض) . ولذلك فأن محبة الحامض Acidophilicity والثباتية في الحامض Acidostability تعتمد على وظائف الاغشية الخلوية ونضوحيتها للأشكال غير المفككة للحامض ، وقد وجد ان بكتريا حامض اللاكتيك تحوي اغشيتها على أنماط معينة من الحوامض الدهنية وكذلك جدرانها التي تحوي مركبات ثابتة بالحموضة .

إن انخفاض الحموضة في المنتجات له تاثيرات ايجابية منها تحسين الطعم وزيادة قبوله من قبل بعض المستهلكين ، كما انها تبعد انواع عديدة من الملوثات وخاصة الاحياء المرضية .

اللبن التقليدي يحضر من *Lb. bulgaricus* و *S. thermophilus* وهذه الاحياء اختيرت على أسس اقتصادية وذلك لان البكتيريتين من المحبة للحرارة ويمكن إتمام عملية تخمر الحليب بدرجة 43 ° م بمدة لا تتجاوز ثلاث ساعات عند استعمال نسب محددة منها ، وهذه البكتريا ليست لها فعاليات علاجية كبيرة . اما الاحياء العلاجية فهي تحتاج الى ظروف خاصة من درجات حرارة وأوساط تنمية ، فهي قد لا تنتج في الحليب كمنتج متخمر وإن حضرت فيه كما هو الحال مع الحليب الأسيدوفيلي الحلو فإن خلايا *Lb. acidophilus* تضاف بأعداد كبيرة ويسوق الحليب مباشرة كي يصل المنتوج الى المستهلك وهو يحوي على اعداد كبيرة من الخلايا الحية .

ولحماية الاحياء العلاجية من التأثير القاتل للحامض يمكن اخذ بعض الاحتياطات منها اجراء Microencapsulation لحمايتها . ولكن الافضل استخدام ظاهرة التطبع في الخلايا مثل إضافتها مبكرا للحليب المراد تخميره أي أثناء الإعداد كي تصبح متحملة للحموضة وزيادة فرص بقاءها ، وفي اثناء التطبع تقوم الخلايا بإنتاج انواعا معينة من البروتينات الوصيفة Chaperones التي يطلق عليها بروتينات الصدمة الحامضية Acid shock proteins(Asp) وهذه الوصيفات تقوم بتعديل طوي البروتينات التي تتضرر بالحوامض الى الوضع الطبيعي ، اذ تستطيع تميز البروتينات غير المطوية بشكل صحيح وعند عدم إمكانية تعديلها تقوم بهضمها أي تظهر فعالية البروتيزات او المساعدة في هضمها . وقد وجدت مثل هذه البروتينات في بعض اجناس بكتريا حامض اللاكتيك التي تنمو بأرقام هيدروجينية واطئة منذ زمن بعيد .

-3 تأثير الأوكسجين : للأوكسجين تاثير ضار على بعض الاحياء العلاجية وذلك ادى الى محدودية تطوير الاغذية العلاجية وتكون سميته واضحة جدا بالنسبة للبكتريا المنشطرة التي هي أحياء لاهوائية مجبرة . وتتعدد تأثيرات الأوكسجين على الاحياء منها إنتاجه لجزيئات فعالة ROSاو تفاعله مع مجاميع السلفهايدريل (SH –) في الانزيمات الاساسية وغيرها من التاثيرات .

ولكن توجد بعض البكتريا لها قابلية مضادة للاكسدة مثل *Lb. fermentum* ME-3 التي تنتج

بيروكسيد الهيدروجين وكذلك انزيم Superoxide dismutase (SOD) الحاوي على المنغنيز.

ولكن لعموم البكتريا العلاجية جرت محاولات لتقليل تاثير الاوكسجين ومنها :

- إزالة الهواء من الحليب قبل تخميره وهذا يحتاج الى تقنيات متخصصة .
- إضافة البكتريا *S. thermophilus* في بداية التخمر اذ ان لها قابلية عالية على استهلاك الأوكسجين ، وبذا يقل الأوكسجين ويشجع هذا نمو وبقاء الاحياء الاخرى مثل البكتريا المنشطرة . ويمكن اقرأن الاحياء التي لا تتحمل الاوكسجين مع اخرى لها فعالية مضادة للأكسدة مثل المذكورة اعلاه .
- استخدام أوعية غير ناضحة للاوكسجين مثل القناني الزجاجية للتعبئة والخزن .
- استخدام مواد مختزلة مثل الحامض الاميني السستئين او استعمال مكتسحات الاوكسجين مثل حامض الاسكوربيك (Vit . C).
- انتخاب سلالات متحملة للاوكسجين .

كما ان استخدام ظاهرة التطبع لاجهاد الاوكسجين او الاجهاد التأكسدي Oxidative stress يمكن ان يكون جزءا من الحل حيث يسمح للخلايا بتطوير آليات مختلفة للتخلص من الاوكسجين وبالتالي التخلص من سميته

4- تاثير الحرارة : وفي هذا المجال فان الاحياء العلاجية تتاثر بعمليات التصنيع التي تكون في بعض مراحلها تحاتج الى الارتفاع بدرجات الحرارة ، والانخفاض عند الخزن وقد تكون الحلول ذات جانبين :

الاول : انتخاب احياء متحملة للحرارة العالية Thermotolerant خاصة عند إعداد مستحضرات بطريقة التجفيف بالرذاذ Spray –drying التي تتضمن استعمال حرارة عالية نوعا ما . ومن الرجوع الى حقيقة ان الاحياء العلاجية هي معزولة من الانسان فهذا يعني انها تعيش بدرجة حرارة 37ْم أي انها غير متحملة للحرارة ولكن توجد بعض السلالات صامدة للحرارة Thermoduric من جنس العصيات اللبنية اما *Ent. faecium , Ent. faecalis* والبكتريا المنشطرة فهي محبة للحرارة نوعا ما لذلك تكون ملائمة في تصنيع الالبان .

ومن العصيات اللبنية توجد سلالات وانواع تقاوم الحرارة مثل *Lb. paracasei* و *Lb. salivarius* التي تستعمل في انتاج المنتجات المجففة بالرذاذ .

ولكن بصورة عامة لا تتحمل العصيات حرارة تكوين الحبيبات Pellets التي تضاف الى العلف الحيواني وتحتاج الى حرارة 60- 80ْم لمدة 5- 10 دقائق وتحت ضغط عالي جدا ، لذلك تكون العصيات غير اقتصادية ، في حين ان *Enterococcus* ذات الخلايا الصغيرة الحجم يمكن

تتحمل هذه الحرارة ولعل هذا السبب هو وراء زيادة تسويق الأخيرة مقارنة بالعصيات اللبنية على الأقل في صناعة الأعلاف .

كما يمكن رفع الحرارة بشكل متدرج ولأوقات معينة للأحياء قبل استعمالها في التصنيع لحث البروتينات الوصيفة الخاصة بمعالجة الاجهاد الحراري اذ تقوم الخلايا بتخليق بروتينات الصدمة الحرارية Heat shock proteins (Hsp) التي توجد منها انواع كثيرة تساعد في الحفاظ على بروتينات الخلية ضمن مدى حراري معين .

اما الطرف الثاني في تاثير الحرارة وهو الانخفاض بدرجات الحرارة والتي عادة تحصل اثناء الخزن فأنها هي الأخرى تؤثر على عيوشية الاحياء العلاجية . فعمليات التجميد تؤثر على معظم الأنواع والأجناس البكتيرية وتؤدي الى نقصان عدد الخلايا الحية بشكل كبير جدا . ولذلك كان لظاهرة التطبع اثر كبير في الحفاظ على عيوشية الخلايا ، ويتم بخفض درجات الحرارة بشكل متدرج وعلى مدى زمني . وتزداد قابلية الخلايا على البقاء بإطالة مدة التبريد وفي اثناء هذه المدة تقوم الخلايا بتخليق البروتينات الوصيفة الملائمة للظروف وهي بروتينات صدمة البرودة Cold shock proteins (Csp) ، ودرست هذه الوصيفات في بكتريا *E. coli* بشكل مفصل ووجد ان نقل الخلايا من 42 ْم الى 10 ْم يؤدي الى تخليق ما يقرب من 50 نوع من الوصيفات لمواجهة الموقف اثناء دقائق . وقد وجدت مثل هذه البروتينات في العديد من بكتريا حامض اللاكتيك مثل *Lc. lactis* ssp *lactis* *Pediococcus pentoseceus* ، فقد وجد ان عيوشية الخلايا تكون بحدود 25-40 % من الخلايا المجمدة بدرجة ــ 20ْم بعد ان تركت بدرجة حرارة 10ْم لمدة ساعتين في حين ان حضنها لمدة 5 ساعات ادى الى زيادة كبيرة للمتبقي منها بعد التجميد .

ومن جهة ثانية يمكن معالجة اجهاد البرد باضافة المواد الحامية من البرودة والتي يوجد العديد منها ويمكن ان تلاءم سلالات وانواع مختلفة .

ثانــيا: الجانب الثاني من معالجة اجهاد الحرارة يمكن ان يعمد الى تحوير العمليات التصنيعية وانتقاء التقنيات اللازمة للإنتاج .

5- التجفيد Lyophilization : عدد كبير من الاحياء العلاجية المسوقة هي بشكل مجفد وبما ان عملية التجفيد تشمل مرحلتين هي التجميد ثم التجفيف لذلك فأن ما يؤثر على الخلايا هو التجميد ، ولكن بتدريب الخلايا على البرودة و السماح للخلايا بتكوين بروتينات الصدمة الباردة يمكن ان يخفف من المشكلة إضافة الى إضافة المواد الحامية من البرودة.

وتتاثر العصيات اللبنية بشكل كبير بعملية التجفيد لذلك وللحفاظ على حيويتها تقيد داخل مواد حامية مثل حبيبات الالجينات Ca-alginate beads الحاوية على مواد حامية من البرودة . او حجزها داخل كبسولات دقيقة للحفاظ عليها اثناء الاعداد .

وعليه فأن اهم نقاط التحول الى العمليات الإنتاجية يمكن ان يكون انتاج سلالات متحملة لاجهادات عمليات التصنيع والإنتاج والخزن ويمكن ان تتدخل الهندسة الوراثية للوصول الى مثل هذه الأهداف

العمليات التصنيعية :

من اهم خطوات تصنيع وتحضير الاحياء العلاجية هو تحضيرها بكميات كبيرة باستعمال المخمرات الكبيرة ، ثم تركيزها ثم إعدادها بالشكل النهائي مع مراعاة شديدة للحفاظ على الخلايا حية . والمستحضرات تعد بمستوى 10^{8}- 10^{10} وحدة تكوين المستعمرات / غم ، ثم تستعمل غرامات قليلة منها لكل يوم ، وفي العلف الحيواني تضاف بمستوى 10^{6}- 10^{7} / غم .

ويمكن إجراء العديد من التحويرات لجعل المستحضرات العلاجية اكثر تداولا وقبولا من قبل المستهلك مثل استعمال عملية تكوين الكبسولات ، او وضع البكتريا داخل حبات ملائمة وكذالك يمكن زيادة الاستفادة من المستحضرات بإضافة مساعدات العلاج الحيوي كعوامل نمو للاحياء العلاجية وغيرها من التحويرات والتي يجب ان تساعد في جعل إيصال الاحياء العلاجية بأفضل حالة وهي حية والى المواقع التي تعمل فيها .

اما عمليات التصنيع الاخرى والتي تشمل استعمال الاحياء العلاجية ضمن الأغذية وفي هذه الحالة يكون استعمال الاحياء العلاجية في المنتجات بشكلين :

1- استعمالها بوادئ للمنتوج .

2- استعمالها مساعدات للبوادئ .

وفي الحالة الأولى وهو استعمالها كبوادئ ليس دائما يلبي الحاجات وذلك لعدم قابلية بعض الاجناس والسلالات على توليد كميات كافية من الحامض اذا كانت تستعمل في الحليب ، ولكن يمكن المساعدة في هذا وهو إضافة بعض المواد للحليب مثل المواد المحفزة للنمو مثل الحامض الاميني السستئين او خلاصة الخميرة او متحللات الكازين .

اما الحالة الثانية وهي الاضافة مع بوادئ اخرى فهذه يجب ان تدرس ويتم التأكد من ان الاحياء لا تظهر بينها ظاهرة التضاد وانما ظاهرة التعايش هي لإنجاح العملية الإنتاجية والتي قد تزيد من معدلات نمو الاحياء العلاجية وتحسين النكهة والمواصفات الحسية Organoleptic characters الاخرى للمنتج النهائي . وفي هذه الحالة ايضا يجب الأخذ بنظر الاعتبار ان إضافة الاحياء العلاجية يجب ان لا يؤدي الى جوانب سلبية على المنتج مثل إظهار نكهات غير مرغوبة كما في انتاج حامض الخليك من قبل البكتريا المنشطرة .

فلتحسين نكهة وطعم الحليب الأسيدوفيلي تضاف الاحياء المنتجة لمركبات النكهة مثل الاستالديهايد وثنائي الاستيل لمعالجة مشكلة النكهة التي يعاني منها المنتج ، اما النسجة فيمكن

اختيار أحياء تنتج السكريات المكوثرة الخارجية او استعمال *Ent. faecium* لتحسين مواصفات جبن الشدر.

وعلى العموم فان طرق تصنيع الألبان العلاجية لابد من ان تخضع لبعض التغيرات التي لا تنطبق على تصنيع الألبان التقليدية ومنها :

- تخفيض درجة الحرارة على حساب وقت التخمر مثل استعمال 37 ْم الملائمة لنمو الاحياء العلاجية بدلا من 43 - 45 ْم المستعملة في تصنيع اللبن العادي .
- تحاشي عملية التحميض المتأخر التي تحصل عند مرحلة تبريد المنتجات مما يؤدي الى قتل الاحياء العلاجية عند استخدامها مع البوادئ التقليدية وهذا يقود الى حقيقة ان الحليب المتخمر لا يمثل الخيار الأفضل لحمل الاحياء العلاجية وانما توجد منتجات أخرى قد توفر حماية اكبر للأحياء العلاجية

الجبن العلاجي Probiotic cheese :

يمثل الجبن منتوج معتدل الحموضة وهذا يؤدي غرضين ، **الأول** هو تقبله بشكل اكبر من المنتجات الحامضية ، **والثاني** زيادة حماية الاحياء العلاجية المستعملة من الحموضة الزائدة التي تتولد في منتجات الحليب المتخمر مثل اللبن . ولذلك اتجهت الأنظار الى انتاج جبن يحمل الاحياء العلاجية وتسوق الآن على مستوى عالمي العديد من الاجبان للأغراض العلاجية ، وقد تكون المشكلة هو إضافة إحياء معزولة من الانسان الى منتجات تحتاج الى عمليات تصنيعية قد تكون قاسية ، ولذلك تنتخب السلالات المناسبة بحيث تكون العمليات التصنيعية غير مؤثرة في عيوشيتها او مواصفاتها أثناء التصنيع والتخزين او عمليات الإنضاج اللاحقة وتوجد طرق مختلفة لإضافة الاحياء العلاجية فمثلا تضاف مع البادئ الى الحليب المعد لتصنيع الجبن او تضاف بعد الحصول على الخثرة .

وأكثر الاجبان استعمالا للإغراض العلاجية هو جبن الشدر وأمكن انتاج أنواع أجبان أخرى مثل الاجبان شبه الصلبة وجبن النشر Spread cheese الغنية بالمواد الدهنية وكذلك أجبان ذات الثقوب مثل الجبن السويسري وغيرها .

واهم الاحياء المستعملة في تصنيع الاجبان العلاجية هي البكتريا العلاجية مثل البكتريا *Bif. infantis* التي تستعمل في انتاج جبن شبيه بالشدر غني بالدهون ويسمى Bifidus cheese . وكذلك استعملت في انتاج الاجبان الصلبة المطبوخة وتستعمل الاحياء العلاجية لصناعة الاجبان المنضجة خاصة ذات مدة الإنضاج القصيرة نسبيا مثل 20 - 30 يوم .

وتكون الاجبان التي يبدأ نضجها من السطح مثالية لحفظ الاحياء العلاجية ، إذ تبقى البيئة الداخلية ثابتة لمدة طويلة مما يتيح فرصة تطبع الأحياء عليها والبقاء مدة طويلة . ومن البكتريا

الأخرى المستعملة *Bif. bifidum* لصناعة جبن الشدر إضافة الى استعمال أنواع أخرى في صناعة جبن الكوتج Cottage .

وتمتاز البكتريا المنشطرة بقدرتها على البقاء في الاجبان مدة طويلة مما شجع استعمالها في الإنتاج ، فهي يمكن ان تبقى ثلاثة أشهر في الاجبان المعبئة تحت التفريغ وبدرجة حرارة 4 ْم دون أن يؤثر على عيوشتيتها او فعالياتها ، إضافة الى إنها لا تؤثر على مكونات الجبن فبقايا اللاكتوز تستهلك في اليوم الاول من تصنيع الجبن من قبل البكتريا وبعد ثلاثة أشهر لم يلاحظ تأثير على البروتينات ونمط ترحيل الكازينات ، إضافة الى عدم تأثير الدهون والأملاح والرماد والرطوبة والرقم الهيدروجيني .

أما بكتريا العلاجية الأخرى المستعملة في صناعة الاجبان فهي العصيات اللبنية مثل *Lb. paracasei* المعزولة من الانسان تستعمل في صناعة جبن الشدر ايضا ، وكذلك استعملت البكتريا *Lb. fermentum* ME3 المعزولة من الانسان والتي لها قابلية مضادة عالية للتأكسد في صناعة أنواع من الجبن الطري . وتمتاز العصيات الأخيرة بملائمتها لصناعة الجبن لأنها تقاوم ظروف التصنيع والخزن دون التأثير على المواصفات الحسية للجبن . والبكتريا تحتفظ بعيوشيتها ومواصفاتها فهي تستطيع استعمال العديد من المواد الموجودة في الجبن بدلا من اللاكتوز الذي يستهلك من قبل البادئ ومن أهمها استعمال الارجينين كمصدر للطاقة الكاربون .

المثلجات العلاجيـــــــــة Probiotic ice cream

بالرغم من ان اللبن العلاجي اكتسب شهرة عالمية من قبل المستهلكين للأغراض العلاجية إلا المثلجات القشطية تمثل وسائل مهمة اذ ان استهلاك اللبن يعتمد على طبائع المجتمعات واستهلاكه قد يتأثر بالعديد من العوامل مثل الحموضة التي لا يتقبلها عدد من الناس اما المثلجات فهي تشكل رافدا مهما لتزويد الاطفال بشكل خاص بالأحياء العلاجية وكذلك تكون لها سوقا رائجة في البلدان الحارة .

والمشكلة مع المثلجات هو ان عملية التجميد بشكل عام تؤدي الى تخفيض العدد العيوشي او العدد الحي بشكل كبير ولذلك كانت عملية اضافة الاحياء العلاجية مهمة جدا وقد حضرت مثلجات علاجية باستخدام البكتريا *Lb. acidophilus* و *Bif. bifidum* بشكل ناجح عند اضافتها مع خليط المثلجات الذي حافظ على عيوشيتها اذ وجد ان 90 % من البكتريا المنشطرة لا تزال حية بعد مرور اكثر من شهرين من الخزن بالتجميد . ولزيادة الفائدة امكن تحضير مثلجات تحوي البكتريا المنشطرة مع اضافة مساعدات العلاج مثل FOS ، ولذلك تشكل المثلجات منتجات جيدة لإيصال البكتريا المنشطرة او غيرها الى أمعاء الانسان .

بعض المستحضرات العلاجية التجارية

يسوق في الوقت الحاضر عددا كبيرا من المنتجات العلاجية والتي يطلق عليها بعض الأحيان الاغذية العلاجية Therapeutic foods او الجيل الثالث من الأغذية المخمرة Third generation fermented foods او منتجات الألبان غير التقليدية Non-classical dairy products او غيرها من التسميات . وقد تكون هذه المنتجات حاوية على سلالة واحدة او أكثر، واكثر المنتجات تحوي خليط من الاحياء العلاجية لزيادة الفوائد الصحية ، إضافة الى ذلك تدعم هذه المنتجات بمساعدات العلاج الحيوية مثل مكوثرات الفركتوز و Lactolulose واللاكتيتول Lactitol وغيرها أي استعمال حالة التآزر الحيوي .

ويمثل اللبن أشهر المنتجات العلاجية ومنه يوجد اللبن المجمد Frozen Yoghurt واللبن المكربن Carbonated Yoghurt , واللبن المجفف سريع الذوبان , Dried/Instant Yoghurt وغيرها. ومن أهمها Yakult المحضر من السلالة *Lb. casei* Shirota الذي يستعمله الملايين خاصة في دول الشرق الأقصى مثل اليابان .

ويمكن ان تستعمل الاحياء العلاجية في الحليب دون تخمير فيوجد حليب مجفد لأغراض خاصة من العلاج .

ومع كل منتوج تظهر قائمة من الامراض التي يمكن ان يستعمل لها المنتوج ومن المستحضرات التجارية المسوقة :

- المنتج VSL#3 مسوق في بلدان أوربا الشمالية ويحوي على أعداد كبيرة من العصيات اللبنية اضافة الى سلالات من البكتريا المنشطرة والبكتريا *S. salivarius* ssp *thermophilus* بشكل مجفد يحوي على حوالي $5 x 10^{11}$ خلية حية لكل غرام ويستعمل لأغراض مختلفة .
- Acetimel cholesterol منتج يستعمل لخفض كولسترول الدم .
- Proviva احد المستحضرات المسوقة في السويد يحوي على احد سلالات *Lb. acidophilus* ويسوق لتخفيض الكولسترول وLDL لدى الاشخاص اللذين لديهم ارتفاع كولسترول متوسط .
- Gaio مستحضر من الحليب المتخمر يسوق لخفض كولسترول الدم في الدول الأوربية .
- CenBiot مستحضر يحوي على سلالات من البكتريا *B. cereus* تستطيع تثبيط *Y. enterocolitica* , *E . coli* ، يستعمل في صناعة الاعلاف .
- Biosporin مستحضر علاجي لتثبيط البكتريا *H. pylori* .

- Enterogermina مستحضر علاجي يحوي على سلالات من جنس *Bacillus* ومنها *B. clausii* يستعمل لعلاج اضطرابات الجهاز الهضمي عقب استعمال المضادات الحيوية
- Subtyl مستحضر علاجي يحوي سلالات من *B. cereus*
- Biosubtyl مستحضر علاجي يحوي سلالات من *Bacillus* منها *B. pumilus*
- Fermalac منتج يسوق على شكل كبسولات مهبلية يحوي على *Lb. rhamnosus* وسلالات اخرى يستعمل لمعالجة التهابات المهبل .
- Lactonorm مستحضر يستعمل لعلاج الإصابات المهبلية .

كما توجد منتجات أخرى لعلاج القناة البولية التناسلية عند النساء والحقيقة المسميات التجارية كثيرة وكثيرة جدا .

- Bioprofit : مستحضر تجاري يعد من المواد الحافظة الحيوية يحوي على السلالات LC-705 و GG وكذلك *Pr. freudenreichii* ssp *shermanii* يستعمل في علف الحيوانات وخاصة الدواجن وله القابلية على الارتباط بسموم الافلا .
- Bactisubtil مستحضر تجاري يحوي على البكتريا *B. cereus* IP 5832 يستعمل كمضاف علفي .
- Ultralavoure مستحضر علاجي يحوي الخميرة *Sc. boulardii* يستعمل لعلاج الإسهال وخاصة عند الأطفال وغيرها من اضطرابات الجهاز الهضمي .
- Fermacto مستحضر علاجي يحوي على *الفطر Aspergillus oryzae* وسلالة من الفطر *Asp. niger* وسلالة من احدى الخمائر يستعمل كمستحضر علاجي للدواجن .
- Bifidogene يحوي على انواع من البكتريا المنشطرة ويسوق لأغراض علاجية مختلفة
- Synerlac يحوي على *Lb. delbrueckii* , *Lb. acidophilus* , *Bif . bifidum* ssp *bulgaricus* يسوق في معظم دول اوربا .
- Lyobifidus يحوي على *Bif . bifidum* يسوق في معظم دول اوربا .

وهناك منتجات عديدة تنتج للاغراض العلاجية تحت مسميات تجارية مختلفة لا يمكن حصرها .

الاغذية الشرقية المخمرة Oriental fermented foods :

اغلب هذه الأغذية تحضر منذ قديم الزمان وليس المقصود منها الأغراض العلاجية ، ولكن اغلبها تضفي الفوائد الصحية عند تناولها ، وتوجد العديد منها تحضر في دول شرق آسيا ، وتكون مواد الأساس فيها معتمدة على توفر المواد الأولية في تلك المناطق . والدراسات التي أجريت أشارت

الى فوائدها وتأثيراتها العلاجية لذلك عدت من الأغذية العلاجية . وفيما يلي ذكر لبعضها المهم والذي درس بإسهاب في مناطق الإنتاج :

الناتو Natto : من الاغذية المخمرة المنتجة في الصين ويسمى ايضا Dou chi ، وينتج في بلدان اخرى مثل اليابان وغيرها من دول المنطقة . المادة الأساس فيه فول الصويا ويمكن ان يعتمد إعداد المنتج على الفلورا الطبيعية للمواد الأولية ، ولكن من الأفضل وهي الحالات الغالبة أضافة بكتريا *B. subtilis* سلالة Natto او ما يسمى Natto bacilli بعد إعداد المواد الأولية .

والبكتريا تعد من الأحياء العلاجية لان تناولها يضفي التأثيرات الصحية على المضيف ، اذ تؤثر على الفلورا الميكروبية المعوية وتحفز الجهاز المناعي ، اضافة الى تأثيرات أخرى . والبكتريا حساسة لأملاح الصفراء لذلك لا توجد في أمعاء الإنسان ، ولكن عندما تؤخذ الابواغ مع الأغذية فإنها يمكن ان تعبر حواجز الجهاز الهضمي وعندما تصل الى مناطق يقل فيها تركيز الأملاح وارتفاع الرقم الهيدروجيني يمكن ان تنبت وتظهر فعالياتها العلاجية .

ومن أوجه تأثيرات منتج الناتو والأحياء الموجودة فيه :

- تنتج البكتريا عددا من الفيتامينات وأهمها K2 (Menaquinone) الذي يساعد في عمليات التجلط وغلق الجروح ، وكذلك يساهم في ايض العظام ويؤدي الى منع ترقق وهشاشة العظام ، وذلك لان غياب فيتامين K2 ومكونات أخرى من الفيتامينات يؤدي الى اضطراب العظام فتصبح سهلة الكسر لذلك يعطى للنساء في سن اليأس لمعالجة الحالة . كما ان الفيتامين يقل بالتدريج في الأشخاص المصابين بـ Crohn's disease لمدة طويلة ولذلك فان تناول الناتو وعصياته تؤدي الى زيادة الفيتامين عندهم .

- تنتج البكتريا عددا من الانزيمات ومن أهمها البروتيز السيريني المعروف بـ Subtilisin والإنزيم يقوم بتفكيك المواد المحسسة في فول الصويا (وهي المواد الأولية المستعملة) ، كما ان له القابلية على تفكيك الألياف Fibrinolytic activity ويسمى Subtilisin NAT ويسمى ايضا Nattokinase . ولذا فهي تساعد العصيات اللبنية على النمو بإنتاجها للـ Subtilisin والكاتليز .

اما فيما يخص فعالية تحليل الألياف للـ Subtilisin ، فالمعروف ان الصفائح الدموية الدائرة والبروتينات المشتقة منها مثل الليفين Fibrin تلعب دورا مهما في تجلط الدم الذي يمنع النزف من الجروح ، ولكن التجلط في بعض المواقع او زيادته يمكن ان تؤدي الى منع سريان الدم واضطراب التجلط Thrombotic disorders لذلك فان علاج التجلط (Thrombolytic therapy) يهدف الى الموازنة بين سيولة الدم وتخثره ، ويعطى المنتج عن طريق الفم ليساعد في تقليل الخثر والجلطات الداخلية .

و Subtilisin كما ذكر أعلاه يقوم بتفكيك المواد المحسسة وبذلك يقلل من ظهور أعراض الحساسية والحفاظ على التوازن بين Th1 , Th2 وما تنتجه من السايتوكاينات كما يحصل عند استعمال العصيات اللبنية (المارة الذكر) .

تؤثر عصيات الناتو على المناعة ، فمثلا الخلايا المقتولة من العصيات تزيد من قابلية الخلايا الابتلاعية على إنتاج اكاسيد النتروجين ، وفي الأفراخ وجد انها تزيد من عدد الخلايا البائية والتائية في الطحال .

ويعتقد ان تأثيرها في الجهاز المناعي يتم بتأثيرها على بعض المستلمات Toll- like receptors التي ترتبط الى بعض مكونات الخلايا الخارجية مثل البيبتيدوكلايكان و LTA (Lipoteichoic acid) وبروتينات الاسواط وغيرها وبذا يتحفز أنتاج السايتوكاينات .

يحوي فول الصويا على Phytoestrogens (Isoflavones) وهذه الفلافونات لها تأثير مانع لسرطان البروستات ولسرطان الثدي (كما ذكر سابقا) ، كما انها تساعد في منع ترقق العظام وأعراض سن اليأس Postmenopausal symptoms عند النساء وأمراض القلب .

ولذلك تحضر مثل هذه الأغذية خاصة وان فول الصويا يحوي على كميات كبيرة من الفلافونات المذكورة لمعالجة بعض الأعراض المذكورة .

الميزو Miso :

معجون صويا مخمر يستعمل في دول الشرق مثل اليابان ويحضر من الصويا وبعض الحبوب ويستعمل كشوربة او حساء ، وتعتمد بوادئه أساسا على الفلورا الطبيعية للمواد الأولية . وقد أجريت العديد من الدراسات في المعاهد المتخصصة ووجد ان للمنتج فوائد متعددة أهمها تأثيره في التخلص من المواد المشعة ، ويمكن إدراج فوائد المنتج :

- يحتوي المنتج على قلويد له القابلية العالية على إزالة المعادن الثقيلة .

المواد الأولية فيه وهي فول الصويا بشكل رئيس تحوي العديد من Isoflavones التي لها تأثيرات مضادة للسرطان ومنها Genistein الذي يعمل مثبطا للـ Tyrosine kinase ، كما ان المركب يظهر فعالية مثبطة للبكتريا *H. pylori* .

- يحوي المنتج على الانزيمات التي تساعد في هضم وامتصاص المواد الغذائية ويحوي الألياف التي تمتز عليها المواد الضارة بالجسم وتطرح الى الخارج .

الأحياء الموجودة فيه تعاكس وتضاد بكتريا التعفن في الأمعاء .

- للمنتج تأثير مضاد للسرطان ، فبصورة عامة فان النباتين يقل عندهم حدوث السرطانات الى معدلات منخفضة ، والميزو كما ذكر أعلاه يحوي بعض الفلافونات الآتية من المواد الأولية وكذلك

يحوي على حوامض دهنية مشبعة وغير مشبعة ومثبطات التربسين وهذه كلها اثبت ان لها تأثيرا مضادا للتطفير .

وتشير الدراسات الوبائية الى قلة حدوث سرطان الثدي عند النساء اليابانيات وقلة حدوث سرطان البروستات عند اليابانيين . والدراسات الإحصائية أوضحت وجود علاقة عكسية بين تناول فول الصويا او منتجاته المتخمرة وحدوث سرطان المعدة ، اذ ان قلة او انعدام تناول فول الصويا يؤدي الى زيادة نسبة الموت بسرطان المعدة في البلدان التي أجريت فيها الإحصائيات .

كما ان الاغذية المتخمرة والمعدة من فول الصويا وغيرها تحوي على السكريات قليلة التعدد أكثر من بقية المصادر والتي تشجع نمو البكتريا المنشطرة والعصيات اللبنية في القولون ووجودها يكون ذو علاقة بقلة حدوث سرطان القولون (كما ذكر سابقا) .

- يساعد الميزو في التخلص من المواد المشعة ، اذ لوحظ عند إلقاء القنابل النووية على هيروشيما وناكازاكي في نهاية الحرب العالمية الثانية قلة او انعدام تأثر العاملين في معامل إنتاج الميزو ، وقد أدت هذه الملاحظة الى إجراء التجارب على الفئران ، ووجد ان إطعامها الميزو يساعد في التخلص من المواد المشعة ، ولهذا زاد استيراد المنتج الى دول أوربا بعد حادثة مفاعل تشرنوبيل عام 1986 بغية التخلص من الإشعاع .
- للميزو علاقة بالكولسترول وأمراض الشيخوخة ، وذلك ان تناوله يقلل من الكولسترول وبالتالي يقلل من امراض القلب . والميزو يحوي على الحامض الدهني Linoleic acid وستيرولات نباتية وفيتامين E وغيرها من المركبات التي تضفي الحماية على القلب .

وللميزو فعالية عالية مضادة للأكسدة ، فاللون الأسمر الذي يظهر على المنتج القديم هي صبغة Melanoidin التي تمنع بقوة إنتاج البيروكسيدات من الحوامض الدهنية في الجسم ، اضافة الى وجود الصابونيات و Daidzein وغيرها التي تساعد في تقليل أمراض الشيخوخة .

يحوي الميزو على الفيتامينات والمواد التي تعاكس ضرر المواد الموجودة في التبغ وبذا يحمي حنجرة المدخن .

منتجات Doenjang , Kimchi :

المنتج الأول يحضر من أوراق اللهانة (الملفوف) وخضر اخرى في كوريا ، والثاني هو صوص الصويا مع الأسماك . والبوادئ الداخلة في عمليات التخمر هي بكتريا حامض اللاكتيك إضافة الى مشاركة أحياء هوائية من البكتريا والخمائر والفطريات .

والتجارب التي اجريت على Kimchi أوضحت انه مصدرا جيدا للعديد من الفيتامينات وطلائعها مثل فيتامين B وكاروتين – بتا وفيتامين C . والخضر الداخلة في تركيبة المنتج وخاصة بعد عملية التخمر لها تأثير مضاد للتطفير خاصة تجاه سم الافلا B1 وكذلك المادة المطفرة NTG

والتي تم اختبارهما باستعمال أنظمة مختلفة مثل نظام أيمس ونظام SOS chromo test ، كما اختبرت باستعمال أنظمة حقيقية النواة مثل استعمال حشرة ذبابة الفاكهة Wing hair spot of *Drosophila melanogastor* ، وقد تمت الاختبارات باستعمال مستخلصات للمنتج بمواد مختلفة .

إضافة الى ذلك استعملت خلاصة Kimchi في تجارب عديدة على خطوط خلايا سرطانية والتي أدت الى منع نموها . وفي الجسم قد تكون الصفات المضادة للسرطان تعود في جزء من فعاليتها الى تحفيز الجهاز المناعي ، اذ ان الخلاصة تزيد من فعالية الخلايا الابتلاعية الكبيرة ، ولكن يمكن ان يكون من خلال التأثير على ايض المطفرات في الجسم .

ويحوي Kimchi على عدد من المركبات مثل 5 - methylcysteine sulfoxide وغيرها التي تقلل من الكولسترول ويؤثر على المركبات ذات العلاقة مثل LDL ,VLDL , HDL والكليسيريدات الثلاثية ، اضافة الى قابليته على تحليل الجلطات .

اما المنتج Doenjang فله علاقة بسرطان المعدة في المناطق التي يستهلك فيها وربما كان ذلك نتيجة لتلوث المواد الأولية بالسموم الفطرية او تلوث المنتج ببعض السلالات المنتجة للسموم عند استعمالها كبوادئ ومنها *Asp. flavus* ولذلك وجب العناية بعملية الإنتاج بشكل كبير . وفي هذا المجال أشارت الدراسات الوبائية الى ان استخدام الأغذية التي تدخل فيها الفطريات يزداد معها خطر الإصابة بسرطان المعدة بنسبة 1.26 .

ومن جهة ثانية فان Doenjang المحضر بمواصفات جيدة تكون له قابلية مضادة للتطفير والتسرطن عند استعمال سلالات أيمس (*Sal. typhimurium*) عند استعمال المواد NTG وسم الافلا B1 . كما ان المنتج (Doenjang) المحضر من فول الصويا يؤدي الى تقليل الكولسترول وأنواع الدهون المتعلقة به ، نظرا لاحتواء المواد الأولية على مثبطات التربسين وحامض الفايتيك والفلافونات والصابونيات وكذلك والاهم Phytoestrogens .

ويحوي المنتج على الببتيدات المخفضة لضغط الدم والتي تثبط الانزيم ACE ومنها الببتيدات Arg- Pro و His- His –Leu التي تكون أكثر تثبيطا للإنزيم من غيرها من الببتيدات الاخرى . ويحوي المنتج ايضا على ببتيدات ضد التجلط او تخثر الدم وبذا تقلل من خطر الاصابات القلبية وارتفاع ضغط الدم .

اغذية اخرى :

هناك إضافة الى ما ذكر وبعيدا عن الأغذية المعتمدة على الحليب كمادة أساس منها وجود مشروبات من الفواكه ، وأغذية معتمدة على اللحوم والحبوب . وكذلك تحضير المايونيز Mayonnaise العلاجي الذي يحضر باضافة البكتريا *Bif. bifidum* بمعدل 10^5 وحدة تكوين

المستعمرات / غم و *Bif. infantis* بمعدل 10^4 / غم وقد تستعمل هذه الأحياء وهي مقيدة داخل تراكيب خاصة في المنتج ، ووجودها يحسن من الصفات الحسية للمنتج ، كما انه يطيل من مدة صلاحية المنتج .

ومن المنتجات الغذائية المتخمرة ذات القيمة العلاجية هي اللهانة المخمرة .

اللهانة المخمرة Sauerkraut :

وهي إحدى المنتجات الغذائية المتخمرة التي زاد الاهتمام بها عالميا لما لها من فوائد صحية وعدت من الأغذية العلاجية وعلى هذا الأساس تسوق في العديد من الأسواق العالمية .

والمنتج يحضر من اللهانة (الملفوف) *Brassica oleracea* var *capitata* وهي تصنع منذ قديم الزمان . وتخضع المواد الأولية لعملية تخمر لاكتيكي تحت ظروف لا هوائية ويعد التخمر بمثابة عملية حفظ حيوي ، والعملية من التخمرات المختلطة وتتأثر بالعديد من العوامل .

وتحصل عملية التخمر بسلسلة من التخمرات المتباينة والمتجانسة تؤدي الى التغيير في البيئة المحيطة بالخلايا ، والعملية تخمر تلقائي معتمدة على الفلورا الطبيعية الموجودة على أوراق اللهانة ، وتحتاج فقط الى تهيئة الظروف الملائمة من درجة حرارة حضن ملائمة وكبس أوراق اللهانة المقطعة في وعاء بعد إضافة الملح على ان لا يتجاوز 2 % ، وعملية تقطيع الأوراق تسمح للمواد الغذائية بالخروج من أوراق النبات ويمكن تقسيم عملية التخمر الى مراحل :

- المرحلة الأولى ويبدأ فيها التخمر بعد إعداد وتهيئة الظروف وتبدأ المرحلة بفعاليات الأحياء المجبرة هوائيا مثل *Acinetobacter* spp , *Flavobacter* spp , *Pseudomonas* وتتلاشى هذه الأحياء بعد استهلاك الأوكسجين وتحول الظروف الى لا هوائية نتيجة لفعاليات الأحياء وكذلك نتيجة لتنفس خلايا الاوراق النباتية الحية ونشاط الأحياء اللاهوائية المختارة ، وتستمر المرحلة لمدة ويكون استنزاف الأوكسجين مرافقا لإنتاج الحوامض العضوية مثل حامض الخليك واللاكتيك والفورميك وغيرها .

- المرحلة الثانية ويحصل فيها انخفاض الرقم الهيدروجيني وتحول الظروف الى اللاهوائية وانخفاض جهد الأكسدة والاختزال وهذه الظروف إضافة الى وجود الملح ، وهذه الظروف تسمح لبكتريا حامض اللاكتيك الموجودة بشكل طبيعي بالنمو على أوراق اللهانة وتصبح هي السائدة ، وتبدأ الاحياء , *Le. mesenteroides* و *Le. faltax* غير المتحملة لتراكيز عالية من الحوامض العضوية وتحت ظروف ملائمة يصل تعدادها الى 10^8 وحدة تكوين المستعمرات / غم بعد مرور 12 – 14 ساعة من بدأ التخمر .

والبكتريا تنتج المزيد من الحوامض وتخفض الرقم الهيدروجيني أكثر وتنتج ثنائي اوكسيد الكاربون لأنها متباينة التخمر ويقوم ثنائي اوكسيد الكاربون بالإحلال محل ما تبقى من الهواء ، وهذه الظروف تساعد في ثباتية فيتامين C في المنتج وكذلك ثباتية اللون للمنتج .

وبعد اكتمال نمو البكتريا أعلاه تبدأ العصيات اللبنية متباينة التخمر مثل *Lb. brevis* وغيرها والتي تكون أكثر تحملا للحموضة والملوحة من البكتريا التي قبلها (*Leconostoc*) .

واعتمادا على درجة الحرارة فان المرحلة الأولى والثانية يمكن ان تستغرق 3 - 6 أيام ويكون حامض اللاكتيك عند نهايتها حوالي 1 % .

المرحلة الثالثة وفيها يكون التخمر بواسطة بكتريا حامض اللاكتيك متجانسة التخمر وتصبح هي السائدة نظرا لكون الظروف لاهوائية والحموضة مرتفعة ووجود نسبة من الملح . ومن الاحياء المشاركة في المرحلة مكورات مسبحية Streptococci والمكورات المعوية Enterococci وأفراد من البكتريا Pediococci ولكن تكون هذه المجاميع بنسب ضئيلة تصل الى 10 % من تعداد بكتريا حامض اللاكتيك الكلي ، اما النسبة الباقية فهي *Lb. plantarum* (Streptobacteria) وتصل نسبتها الى 30 – 80 % وهي التي تقوم بالدور الاساسي في التخمر ، وتوجد في هذه المرحلة بكتريا اخرى مثل *Lb. curvatus , Lb. sakei* ، وتصل الحموضة الى 1.5 -2 % وتعبأ اللهانة عندما يصل الرقم الهيدروجيني 3.8 – 4.1 .

ويمكن ان تقوم بعض الاحياء بتخمير سكريات أخرى مثل الزايلوز والعرابينوز وتصبح هي السائدة في المراحل النهائية .

الأمينات الحيوية : عند عدم ملائمة الظروف او عدم العناية بظروف التخمر فان الاحياء الموجودة خاصة البكترية السالبة لصبغة كرام من العائلة المعوية يمكن ان تولد بعض الأمينات (كما في حالة تخمر اللحوم) والتي توجد في بداية التخمر ولكن تتلاشى بالتنافس مع بكتريا حامض اللاكتيك .

والأمينات الحرة والتي هي بمثابة قواعد عضوية يمكن ان تسبب التسمم ، ويحدث التاثير بشكل تقليدي بواسطة الهستامين عندما تصل نسبته الى 50 ملغم / 100 غم من اللهانة ، والهستامين يوجد في اوراق اللهانة الطبيعية بحدود 12 – 78 ملغم / كغم لهانة . ومن أعراضه الحساسية مثل العطاس والصداع النصفي (داء الشقيقة) وصعوبة في التنفس وأعراض اخرى .

ومن الأمينات الأخرى Putrescine الذي يمكن ان يصل تركيزه في بعض الحالات الى 146 ملغم / كغم لهانة ، و Tyramine يصل الى 174 ملغم / كغم لهانة وكذلك Cadaverine يصل الى 50 ملغم / كغم وقد يتولد Spermidine . ويمكن تقليل هذه المستويات بالعناية بالتصنيع والتبريد بعد انتهاء التخمر . ويمكن تقليل ظهور الأمينات بإضافة البوادي مثل *Lb. plantarum* ذات الفعالية المنخفضة لإنزيمات Amino acid decarboxylases .

الفوائد الصحية للمنتج

لهذا المنتج فوائد صحية كثيرة ، بداية تكون اللهانة مصدرا جيدا للفيتامينات مثل فيتامين C وأملاح المعادن والألياف . كما ان اللهانة تعود الى العائلة الصليبية التي تحوي على تراكيز عالية من Glucosinolates التي تصل الى 1 % من الوزن الجاف ، وتعاني هذه المركبات من التحلل بواسطة الإنزيمات مثل Myrosinase وتنتج الاندولات و Isothiocyanates وهي من المثبطات القوية للسرطانات ، اذ تمنع الانقسام الخيطي وتشجع الاستماتة في خلايا الورم البشرية ، وتؤثر ايضا على التحولات الإنزيمية للطور الأول والثاني للمواد المسرطنة لذلك تكون ذات علاقة وثيقة بالعديد من عمليات التسرطن بالكيماويات مثل عمليات الايض للمطفرات الأولية Promutagens وعمليات ارتباط الكيماويات الى DNA وكذلك تثبيط إنزيمات Cyt. P450 والتي تكون عاملة في تنشيط عمليات التسرطن ، اضافة الى احتواء اللهانة المخمرة على بكتريا حامض اللاكتيك التي تعد من الأحياء العلاجية متعددة الأغراض (يراجع الفصل الثامن) .

ومما ذكر اعلاه حول منتج اللهانة المخمرة وفوائده يمكن ان يبرز دور البكتريا *Lb. plantarum* التي تعد الأساس في الإنتاج ، اضافة الى انها تكون اللاعب الرئيس في عملية السيلجة لإنتاج العلف الحيواني .

والبكتريا تكون منتشرة بكثرة على النباتات وتمتاز بتحملها ومقاومتها للعفصيات Tannins التي تكثر في النباتات وهي مركبات فينولية متعددة تذوب في الماء ، أوزانها الجزيئية عالية ولها القابلية على ترسيب البروتينات ولذلك تثبط عددا من الاحياء ، وتوجد أنواعا منها غير قابلة للتحلل لذلك تكون مقاومة للغزو من قبل الاحياء .

ونظرا لوجود *Lb. plantarum* في بيئات تكثر فيها المواد العفصية فهي تملك إنزيم Tannase وتستطيع تكسير المركبات وإجراء العمليات الايضية عليها وينتج منها بعض الأحيان Phenyl acids مثل حامض البنزويك وكذلك حوامض Phenyl lactic acids التي لها قابلية مضادة قوية تجاه الفطريات لذلك تساهم في حماية النباتات ، كما ان تحليلها للعفصيات في الأغذية سوف يؤثر بشكل سلبي على القيمة الغذائية الغنية بها ، ولكن ربما يكون له تأثير على الحالة الفسلجية للقناة الهضمية للمضيف . والأغذية الغنية بالعفصيات تعطي الفرصة لانتخاب *Lb. plantarum* مقارنة بالأحياء الأخرى التي لا تستطيع تفكيكها او تثبط بها .

وسلالات *Lb. plantarum* 299 و 229V يمكن ان تعبر الحواجز في القناة الهضمية وعند تناولها تؤدي الى زيادة العصيات مقابل البكتريا السالبة لصبغة كرام واللاهوائيات وأفراد العائلة المعوية والتي تضم مجموعة من الأحياء المرضية وغير المرضية والأخيرة يمكن ان تتحول الى ممرضات عندما يختل الجهاز المناعي . وكذلك تقلل من الكلوستريديا المختزلة – Sulfite

reducing clostridia والتي تضم مجموعة من السلالات المنتجة للسموم وأخرى تنتج غاز H_2S السام وكذلك تنتج المواد المسرطنة

والسلالات اللبنية المذكورة لها تأثيرات قاتلة للأحياء خارج الأنظمة الحية منها قتل *L. monocytogenes* , *B. subtilis* , *E. coli* , *Y. enterocolitica* , *Citrobacter freundii* , *Enterobacter cloacae* , *Ent. faecalis* .

وتؤثر البكتريا *Lb. plantarum* على الاحياء اللاهوائية السالبة لصبغة كرام التي تولد السموم الداخلية خاصة عند حصول التلوث بها عقب العمليات الجراحية والتي تنتج المواد المسرطنة .

ويمكن للسلالة 229V ان تمنع التصاق السلالات المرضية من *E. coli* وغيرها مثل *Salmonella* , *Shigella* و *Campylobacter* من خلال زيادة التعبير عن المخاط وبذا تمنع التصاقها إضافة الى منافستها على مواقع الالتصاق . كما العصيات اللبنية تمنع عبور الأحياء الممرضة من الأمعاء الى الأعضاء والأنسجة اللمفاوية وذلك بتحسينها للطبقة المخاطية للأمعاء .

ومن الفوائد الاخرى التي تعزى الى البكتريا *Lb. plantarum* هو تفكيكها لعوامل الإصابة بأمراض الشرايين التاجية للأشخاص المعرضين للإصابة بها مثل اللذين يعانون من ارتفاع الكولسترول اذ تساعد في تقليل الكولسترول و LDL- Cholesterol إضافة الى تقليلها لضغط الدم و تقليل Fibrinogen .

وتؤثر *Lb. plantarum* في حالات Irritable bowel syndrome (IBS) التي تكون غير معروفة الأسباب وتمثل مجموعة من الاضطرابات تؤدي الى أعراض متشابه مثل الآلام البطنية والإسهال او حدوث الإمساك عند البعض مع الانتفاخ والعرض الأخير قد يكون ناتجا من التخمرات غير الطبيعية في القولون وإنتاج الغازات مثل غاز الهيدروجين من قبل بعض الأحياء التي لا يمكن عزلها في مثل هذه الحالات والتي تتصف بالعودة والتكرار. والمعتقد ان *Lb. plantarum* تقوم بكبح الاحياء المسئولة عن توليد الغازات كما يحصل عند استعمال منتجات علاجية مثل Proviva .

وتستعمل *Lb. plantarum* في معالجة IBD (Inflammatory bowel disease) ، وتتصف الحالة بكونها التهاب مزمن في القناة الهضمية خاصة الأمعاء الغليظة ويؤدي في بعض الأحيان الى توليد التهاب القولون التقرحي Ulcerative colitis والذي يمكن ان يوجد في أي منطقة من القناة الهضمية كما هو الحال مع Crohn's disease ، وهذه الأمراض يعتقد انها تنتج من عدم انتظام الاستجابة المناعية وقد تكون الفلورا الطبيعة هي السبب بتداخلها مع الجهاز المناعي ، ولذلك فان استعمال *Lb. plantarum* يمكن ان ينظم الاستجابة المناعية ويؤدي الى التخلص من هذه الأعراض .

وبصورة عامة فان *Lb. plantarum* يمكن ان تساعد في التقليل او الشفاء من عدد من الأعراض في الجهاز الهضمي غير المذكورة أعلاه ومنها الإسهال الذي يعقب العلاج الإشعاعي ، وكذلك التهاب القولون Colitis و Chronic pouchitis (وهو التهاب غير متخصص في منطقة أللفائفي Ileal reservoir) .

ان التاثيرات المتعددة للـــ *Lb. plantarum* لابد وان تكون بتداخل مع الجهاز المناعي في الجسم ، فهي تزيد من التعبير عن إنتاج السايتوكاينات في الخلايا سواء خارج الجسم او داخل الجسم مثل تحفيزها لإنتاج IL- 10 , IL-12 . وقد لوحظ ان إطعام السلالة 229V من *Lb. plantarum* في الفئران يؤدي الى زيادة IgA وكذلك زيادة عدد الخلايا اللمفاوية CD4 , CD25 وقللت من تكاثر خلايا الطحال ، وهذا يعني ان السلالة يمكن ان تحور الاستجابة للمستضدات الموجودة في القناة الهضمية

وفي دراسة أخرى على الأطفال المعرضين او المصابين بفيروس HIV فان إعطاء *Lb. plantarum* في Oatmeal gruel أي عصيدة الشوفان التي تحوي على مساعدات العلاج الحيوي المتمثلة بوجود الشوفان ادى ذلك الى تحفيز الاستجابات المناعية الجهازية بدون تأثير عليهم حتى عند استعمالها لمدة طويلة .

ومما ذكر اعلاه يتضح زيادة الاهتمام باللهانة المخمرة نظرا لاحتوائها على *Lb. plantarum* ، واضلفة الى مشاركة العديد من الاحياء في مراحل التخمر الاولى والتي سجل لها التاثيرات الايجابية .

الفصل الثاني عشر

تشريعات السلامة للاحياء العلاجية

تشريعات السلامة للأحياء العلاجية

قبلت المنظمات التابعة لهيئة الأمم المتحدة مثل منظمة الصحة العالمية WHO ومنظمة الزراعة والغذاء FAO على ان Probiotic هي أدوية حاوية على احياء مجهرية ولعل أهمها بكتريا حامض اللاكتيك ، ونظرا لكون الانسان بشكل أساسي هو المعني بهذه الأدوية ثم الحيوانات بالدرجة الثانية ، لذلك قامت الجهات المختصة بمهمة وضع التشريعات والقيود حول استعمالها كما هو حاصل حول تقيم الأدوية الكيماوية قبل طرحها للأسواق .

ففي مايس عام 2002 وضعت مسودة للخطوط العريضة لتقيم الاحياء العلاجية . وكانت اغلب بنودها تركز على الغذاء ، ولتكون هذه المسودة مرجعا للأطباء والعاملين في مجال التغذية ليكونوا على دراية بموثوقية المواد التي يستعملوها . وقد أمكن طرح العديد من السلالات التي لم يلاحظ عليها أي تأثيرات سلبية .

وقد خاضت اللجان في كل صغيرة وكبيرة تتعلق بالاحياء العلاجية . ومن اهم الجهات في الحقيقة التي اهتمت بالموضوع هي الاتحاد الأوربي . وقد كانت بعض التشريعات والتعليمات متناقضة في بعض الأحيان كما سيتم مناقشته لاحقا .

فيما يخص بكتريا حامض اللاكتيك التي تستعمل كاحياء علاجية فهي تعد أمينة الاستعمال GRAS وهي منتشرة بشكل واسع ومتعايشة مع الانسان في الامعاء ولها تاريخ طويل في الاستعمال السليم في منتجات الحليب المتخمر وهي تستعمل لفئات معينة من المجتمع بكثرة مثل الأطفال وكبار السن وكذلك في الأشخاص منقوصي او معلولي المناعة وقد وضعت مواصفات للبكتريا المستعملة سبق ذكرها .

وقد أثيرت بعض النقاط حول استعمال بكتريا حامض اللاكتيك إذ وجد وتحت ظروف معينة ان بعض السلالات يمكن ان تنتج الامينيات والمواد الضارة للمضيف مثل Histamine ، Tyramine ، Agmatin ، Cadaverine ، والامونيا والفينولات وغيرها . كما ان هناك شواهد قد تمنع استعمال الاحياء العلاجية (بكتريا حامض اللاكتيك) بشكل محدود ، وكذلك وجد ان احدى السلالات كانت لها القابلية على تخفيض الكولسترول في الدم لانها تثبط الانزيم HMG-CoA reductase كما انها تقلل من LDL بنسبة 45 % ولكنها تؤدي الى تحلل العضلات المخططة Rhabdomyolysis وتدمير بعض اعضاء الجسم مثل الكلى والموت في الحيوانات . وذلك لان الفلورا الطبيعية في للأمعاء (ومنها بكتريا حامض اللاكتيك) يمكن ان تسبب المشاكل في بعض الحالات وبذلك تكون جزءا من المشكلة وليس حلا كما هو الحال مع امراض الامعاء الملتهبة والتهاب المفاصل الروماتويدي والحساسية الغذائية وبعض انواع

امراض المناعة الذاتية. والحقيقة ان مثل هذه الحالات قليلة جدا ونادرة ويجب التعامل معها بحذر في فئات خاصة مثل معلولي المناعة او الأشخاص الذين عندهم نزف في الامعاء وبما ان الاحياء العلاجية مثل بكتريا حامض اللاكتيك تحث الاستجابات المناعية كان الحذر واجبا عند الأشخاص المعرضين للإصابة بالتهاب المفاصل لتجنب التعقيدات الأخرى وان كانت هذه الحالة يمكن تجاوزها بتعديل الجرع المستعملة . ومثل هذه المشاكل يمكن ان تحصل مع أي مادة دوائية ، فلا يوجد دواء يمكن استعماله بشكل مطلق ولذا تظهر مع الأدوية قائمة بالتأثيرات الجانبية لوضع المستهلك في وضع الاختيار .

وقد كان السجال ولا يزال بين مؤيدي استعمال الاحياء العلاجية والجماعة التي تريد الحد من استعمالها . وكانت مشكلة البكتريا *Enterococcus* محط هذا الجدل ، فالبكتريا لا تعد من GRAS وهي تستعمل في بعض الحالات العلاجية وان كانت WHO و FAOعام 2001 نصحت بعدم استعمالها . والبكتريا توجد بأعداد كبيرة في الامعاء وتدخل في تشكيلات المستحضرات التجارية مع أحياء علاجية أخرى Probiotic cocktails خاصة في العلف الحيواني ، ولكن البكتريا هي احد مسببات الإصابات المستشفوية والعديد من سلالاتها مقاومة للمضاد الحيوي الفانكومايسين الذي يعد الاختيار الاول لعلاج الاصابت بالبكترية المقاومة للمضادات الحيوية . ولكن الإصابة بها في بعض المرضى قد تكون اتية من الفلورا الطبيعية لامعائهم وبذا لا يمكن تجنبها . ولكنها تستعمل في حالات خاصة عندما تكون الحل الوحيد للعلاج ولذلك فأن التشريعات تعطل عندما تكون الفائدة تفوق بكثير المضار التي يمكن ان تنجم عنها ، وقد سجلت حالة سلبية بالنسبة للخميرة *Sc. boulardii* اذ سببت وجود الفطريات في الدم Fungemia ولكن في شخص او أشخاص تعرضوا لإجهاد صحي عالي ، وكذلك الحال بالنسبة لبكتريا *B. subtilis* عند استعمال المستحضر Enterogermina في احد كبار السن . وهذه حالات فرادى ويمكن ان تحصل مع أي من الأدوية او حتى المواد البسيطة كما ذكر انفا ، اما معظم الاحياء العلاجية وخاصة بكتريا حامض اللاكتيك فلم تظهر أي تقارير تشير الى نتائج سلبية حولها .

التوصيات اللازمة لقبول الاحياء العلاجية

أكدت الجهات المتخصصة وضمن مواصفاتها ان تكون البكتريا المستعملة كأحياء علاجية بالنسبة للإنسان معزولة من الانسان وذلك لتلافي رفض الجهاز المناعي لها كما تم إيضاحه مسبقا ومن اهم النقاط التي توصي بها التشريعات والتي قسمت الى ثلاث مراحل رئيسة:

المرحلة الاولى : وهي تخص تصنيف وتعريف الكائن او السلالة بشكل جيد جدا ومن كافة النواحي . ويكون التصنيف الى حد الجنس والنوع وربما السلالة ويكون ذلك بالاعتماد على

الطرق المقبولة عالميا مثل استعمال الفحوص الشكلية الخارجية والصفات الكيموحيوية ثم استعمال الطرق الجزيئية مثل التهجين DNA/DNA hybridization وتحديد توالي القواعد في الجينات وخاصة تلك التي تشفر16S rRNA . وللوصول الى السلالة تعد تقنية Pulsed field gel electrophoresis هي المفضلة وكذلك يمكن استعمال Randomly amplified polymorphic DNA ويجب ان يحدد وجود العناصر الوراثية غير الكروموسومية مثل وجود البلازميدات والنسق البلازميدي ووجود العناصر القافزة ، ويجب تحديد نمط فعاليتها الحيوية وكذلك نمط مقاومتها للمضادات الحيوية . واجراء الفحوص اللازمة لتحديد قابليتها على انتاج السموم وكذلك اجراء فحوص على مزارع الخلايا الحية وتحديد قابلية للالتصاق والاصابة .

وعند تشخيص السلالة بشكل كامل تسمى بالرجوع الى المراجع العالمية لتسمية الاحياء المجهرية وذلك لتسهل على الاطباء والمستهلكين تتبع النشرات او البحوث المنشورة حولها والتأكد من فوائدها الصحية .

الدراسات خارج الجسم الحي

ويجب ان تجري على الاحياء دراسات خارج الجسم لاختبار قابليتها على الالتصاق الى الخلايا وانتاج البكتريوسينات والمواد القاتلة مثل بيروكسيد الهيدروجين وتجميع الممرضات وكذلك فحص قابلية مقاومة أملاح الصفراء التي تشير الى إمكانية بقائها في القناة الهضمية وكذلك مقاومة مبيدات النطف بالنسبة للأحياء المزمع استعمالها في المهبل .

الدراسات داخل الجسم الحي :

ويجب ان تجرب داخل الجسم الحي وذلك باستعمال الحيوانات كنماذج دراسية وذلك لان التجارب خارج الجسم لا تكفي لان الوضع داخل الجسم يختلف تماما من حيث الظروف البيئية المحيطة وتداخلاتها مع الاحياء وبذلك فأن دراسة وضع الاحياء داخل الجسم يعد المفتاح الرئيس للآليات التي تعمل بها كما انه يعد من المؤشرات القوية لقبولها . وتدرس المؤشرات التي تتعلق بإدخالها الى الجسم الحي ومن اهمها عدم حصول الأصابة في الموديلات الحيوانية مثل الفئران منقوصة المناعة وكذلك تحديد السمية الحادة ودون الحادة عند ابتلاع اعداد كبيرة من الخلايا .

وتضاف الكثير من الفحوص التي قد تكون متخصصة في بعض الحالات فمثلا ان العصيات اللبنية تلتصق الى خلايا الامعاء وتثير انتاج المخاط الذي يمنع الممرضات من الالتصاق كإحدى آليات تأثيرها ، ولكن توجد وسائل اخرى لتوضيح تداخل العصيات اللبنية مع الامعاء مثل *E. coli* فيمكن عزل (LTA) ودراسة تأثيره على المسبب للالتهابات وهي LPS من *E. coli* ويدرس

تأثير LTA داخل الجسم الحي ويلاحظ تنافسه مع LPS على CD14 التي هي مكان ارتباط LPS .

ومثل هذه الدراسات توضح كيف تقوم الاحياء العلاجية بالتأثير لغرض جسر الهوة وزيادة تقبل المستهلك .

واضافة الى ذلك تحدد الجرع المستعملة فمويا للمتبرعين ثم اجراء دراسة تغذوية لملاحظة تأثيراتها على جسم الانسان وأيضه .

المرحلة الثانية : هي تحديد فاعلية وفوائد الاحياء بعيدا عن التأثيرات الشخصية ويكون ذلك باستعمال دراسات الغفل مزدوج التعمية العشوائي Randomized double-blind placebo والمعطيات الناتجة يجب ان تكون مهمة إحصائيا وتكون مؤدية الى تحسين الحالة الصحية والظروف الحيوية ، او تؤدي الى الشفاء السريع او تقلل من خطر الإصابة بالإمراض او إطالة المدة عند حدوث عودة الإصابة كما يحصل في بعض الإمراض .

ويجب الأخذ بنظر الاعتبار ان دراسة معالجة الإصابات بالإحياء المجهرية الممرضة تستغرق وقت قصير مثلا سنة ولكن بعض الإمراض المستعصية مثل السرطان قد تأخذ وقت أطول .

ومثل هذه الحالات يجب ان تكون هناك دراسات موسعة أي وجود عدد كبير في مجموعة المعاملة وكذلك معاملة السيطرة ، إضافة الى إجراء الدراسات الوبائية الموسعة Epidemiological studies .

المرحلة الثالثة : وتعنى بمقارنة تأثير استعمال الاحياء العلاجية مع العلاجات القياسية خاصة بالنسبة للأمراض النادرة . وهذا يعني ان المرحلة الثالثة تهتم بالتخطيط الملائم لعدد كبير من النقاط مثل تحديد المكان الصحيح للأحياء العلاجية وقابليتها على منع الإعراض السريرية وغيرها قبل الرفض .

وتنص التوصيات على ان معلومات كافية عن المستحضرات العلاجية يجب ان تزود للطبيب او المستهلك مثل الإعداد ، وكذلك الإضافات المستعملة في المستحضر سواء كان سائلا كما في انتاج GG في فلندا ، والتي تنتج على شكل كبسولات في بلدان أخرى أي العناية بتركيبة الدواء كي يكون من السهل تقبلها .

التشريعات الخاصة بالإحياء العلاجية المهندسة وراثيا :

أكثر التشريعات التي ظهرت حول الاحياء المحورة وراثيا GMOs ركزت على الطرق المستعملة في التحوير وليس على المنتج النهائي . وفي مجال الاحياء العلاجية وخاصة بكتريا حامض اللاكتيك التي تعد Food grade microorganisms ، فالاحياء تقبل في أنتاج الأغذية عندما يكون لها تاريخ طويل أمين ، ومثل هذه الاحياء او السلالات هي التي تستعمل كخلايا مستلمة

او قابلة للتحوير الوراثي ، وعليه فلا يسمح باستعمال الاحياء المرضية ، ولكن هذه ليست قاعدة عامة فيمكن لبعض الاحياء ان تنتج السموم تحت ظروف معينة ولذلك وجب استبعادها من الأغذية .

الإخطار المحتملة من استعمال بكتريا حامض اللاكتيك المحورة وراثيا:

ان التحوير الوراثي بأي طريقة وإضافة DNA جديد وملحقاته يمكن ان تؤدي الى توليد بكتريا ذات صفات جديدة وخلايا ذات تصرفات جديدة وهذا سيؤدي الى نتائج وتأثيرات مختلفة . ولذلك قسمت التأثيرات الى نوعين :

أولا: التأثيرات غير المقصودة : وهي التي تنتج من التحوير الوراثي ويؤدي الى انتاج بكتريا جديدة في تصرفاتها. وهي تكون عادة غير متوقعة وتختلف عن تلك المتوقعة التي اجري من اجلها التغير الوراثي وتحدث التأثيرات غير المقصودة لعدة أسباب :

1- مثلا تغير جين معين او إدخاله في اوبرون محدد يمكن ان يؤثر على تعبير الجينات المجاورة ويمكن ان يؤدي الى انتاج بروتينات سامة او مولدة للحساسية خاصة عندما تكون التحويرات بعد الترجمة Post-translational في الخلية المضيفة تختلف عن تلك التي اشتق منها ألجين .

2- قد يحصل انتاج بروتين خيمري اي غير متجانس Chimeric protein (Fusion protein) نتيجة لإقحام DNA الغريب في مكان غير ملائم ، وهذه البروتينات الناتجة قد تؤثر تأثيرا واضحا على تصرف الخلايا ويمكن ان تولد السمية او الحساسية في المستهلك نتيجة لتركيبها الجديد .

ولذلك فان الدراسات المعقمة والتحليلات المناسبة قبل وبعد أجراء التغيرات الوراثية يمكن ان تجنب حدوث هذه التأثيرات غير المقصودة ، فمثلا اختيار المواقع Loci الملائمة لإقحام DNA الجديد قد يساعد في منع التأثير على الجينات المجاورة .

وتشير تعليمات الاتحاد الأوربي الى ان الاحياء الناتجة من التطفير العشوائي لا تعد مهندسة وراثيا ألا ان الحالات المذكورة أعلاه واردة الحدوث عند استعمال التطفير العشوائي ، إذ يمكن ان تخلق أنزيمات محورة تؤثر على عمليات الايض وإنتاج مواد ايض غير متوقعة والتي يمكن ان تؤثر على صحة المستهلك ولذا فلا غرابة ان تكون بعض بكتريا حامض اللاكتيك المهندسة وراثيا Genetically modified lactic acid bacteria (GM-LAB) أكثر أمانا من الناتجة من التطفير العشوائي .

ثانيا : التأثيرات غير المتوقعة وغير المقصودة : وهذه تحدث نتيجة التغيرات الوراثية فالتعبير المفرط عن بعض المواد الايضية او غلق مسار ايضي فيها قد يؤدي الى تأثيرات غير متوقعة واستجابات غير مرغوب فيها في الخلايا . فمثلا في البكتريا *Lb. johnsonii* التي

أعطب فيها ألجين *ldh* D المسئول عن تكوين D-lactate الذي يترتب عليه عدم القدرة على توجيه المنتجات الأولية والثانوية بكميات كبيرة الى مسارات ايضية أخرى .

ومن الامثلة الاخرى فان فرط الإنتاج لمادة معينة يمكن ان يثبط انتاج مواد أخرى فهندسة الاحياء لإنتاج كميات كبيرة من الرايبوفلافين والفولات والتي تبدأ بـ GTP كمادة اساس تستهلك كميات كبيرة من GTP في التخليق مما يجعل مستواه واطئا لمسارات اخرى تحتاجه .

كما ان هندسة بعض الاحياء لإنتاج مواد مضادة يمكن ان تؤدي الى تعطيل العمليات الإنتاجية المعتمدة على البوادئ المختلفة فمثلا في Sauerkraut (اللهانة او الملفوف المتخمر) والذي تبدأ فيه عمليات التخمر بتأثير البكتريا *Le. mesenteroides* ثم يكمل التخمر بالبكتريا *Lb. plantarum* ، فان انتاج المواد المثبطة من قبل الاحياء الأولى يمكن ان تؤدي الى تعطيل عملية التخمر لذا كان التوازن ضروريا وإلا فانه سيؤدي الى تغييرات غير مقصودة في المنتوج النهائي .

ومن التأثيرات غير المقصودة هو ما يحدث في الامعاء فاذا استعملت أحياء مهندسة وراثيا GM-LAB فان هذه ستكون بتلامس مع الفلورا الطبيعية وهذا يمكن ان يؤدي الى نقل أفقي للجينات سواء بالبلازميدات او الجينات القافزة او العاثيات وقطع DNA العارية.

التقنيات الحديثة وهندسة بكتريا حامض اللاكتيك

ان التطورات الحديثة في مجال الوراثة والكيمياء الحيوية وعالم الحاسبات يمكن ان تستغل لزيادة الموثوقية والتعجيل بإعلان سلامة الاحياء المخمرة والأغذية المشتقة منها . والحقيقة ان هذا لا ينطبق على بكتريا حامض اللاكتيك وانما على الخلايا المزمع تحويرها .

وقد مر اعلاه من ان التغير الوراثي او الهندسة الوراثية قد تؤدي الى تاثيرات قد تكون متوقعة او غير متوقعة ، مقصودة او غير مقصودة ، ولذلك فان الهندسة الوراثية بمفهومها الضيق الذي يقتصر على تغيرات المواد الوراثية لا تلبي متطلبات وطروحات الانسان لذلك حلت محلها الهندسة الحيوية Bioengineering او هندسة الايض Metabolic engineering لان البروتينات والأنزيمات عند تغيير تراكيزها او فعالياتها نتيجة الهندسة الوراثية لا يمكن ان تعمل لوحدها وانما تكون ضمن شبكة من الجزيئات والتفاعلات والمسارات الايضية سواء كانت بنائية او هدمية ، لذلك دخل مفهوم المعلوماتية الحيوية Bioinformatics بثقل في مجال تحوير الاحياء . وتظافرت الدراسات في مجال الدراسات الوراثية Genomics التي تشمل دراسات DNA ودراسة مستنسخات المادة الوراثية او مكنون النسخ Transcriptomics DNA والتي تتناول ما ينتج من استنساخ المعلومات الوراثية وكذلك المكنون ألبروتيني Proteomics التي تتناول دراسة البروتينات من كل نواحيها ، والمكنون الايضي Metabolomics التي تدرس المسارات الايضية ،

وكل هذه المفاهيم او المجالات يمكن ان توضع في قواعد معلومات Databases للرجوع إليها عند الحاجة .

- فضمن مجال Genomics قد تم تحديد توالي القواعد النتروجينية Complete genome sequence في جينوم عدد من الاحياء الطبيعية وما يقابلها من الاحياء المطفرة لعدد من الاحياء المهمة مثل *Lc. lactis* المهمة من النواحي التصنيعية باستعمال عدد من التقنيات مثل تقنية البصمة الوراثية Fingerprint technique ، وهذا ساعد في تبيان المواقع التي حصلت فيها الطفرات والتي يمكن ان تؤدي الى التأثيرات المذكورة انفا .
- وتم تحديد مكنون النسخ Transcriptome باستعمال رقائق (DNA chip DNA technology) او رقائق الجينات Gene chips ، وهذه فائدتها تعطي فكرة عن التغيرات الحاصلة في نمط التعبير للأحياء الجديدة المحورة وراثيا مقارنة بالأحياء الطبيعية وبذلك فإنها تشكل نقطة بداية لدراسة تفاعل المواد الناتجة للإنزيمات المشفر لها بالجينات تحت الدراسة .
- اما المكنون ألبروتيني Proteome والذي يجب ان يحلل في مجال الأغذية للأحياء المحورة وراثيا باستعمال الترحيل الكهربائي 2D- gel electrophoresis او استعمال 2D-HPLC او استعمال وسائل اخرى لإعطاء معلومات دقيقة عن البروتينات الجديدة وتراكيزها . ومثل هذه التحاليل تكون مفيدة جدا فمثلا عند تحوير الرز لإنتاج حاصل يحوي على بروتينات مخزونة اكثر أشارت تحاليل الترحيل الكهربائي الى وجود كميات كبيرة من الأمنيات المتعددة غير المرغوب فيها
- وتحليل المواد الايضية الناتجة (المكنون الايضي) Metabolome يوضح وجود مواد ايضية جديدة يمكن ان تنتج من التحوير ولذلك وجب تحليلها بمدى واسع من التقنيات . كما ان المنتجات الجديدة الناتجة من أحياء محورة يجب ان يحدد تركيزها وتقارن مع مقاييس الاستهلاك اليومي Daily recommended intake (DRI) حتى لا يتأذى المستهلك منها ، فقلة بعض المواد الحيوية يمكن ان يقلل من القيمة الغذائية للمنتج ، كما ان زيادته قد تؤدي الى نتائج غير مرغوبة فيها وعليه فتقدير التراكيز ونوعية البروتينات الجديدة تكون بداية لدراسة السمية .

ولزيادة وتقوية مسالة السلامة فان كل من مكنون النسخ والمكنون البروتيني والمكنون الايضي يجب ان تدرس تحت ظروف القناة الهضمية والظروف الأخيرة تكون ضرورية فيما اذا كانت السلالات يمكنها العيش في امعاء الانسان ، وحتى تقبل هذه النتائج يجب ان تكون استنتاجات هذه الدراسات هو ان الاحياء ليست لها تأثيرات مقصودة مضرة على صحة الانسان وهذا يعني انه لم يتم انتاج أي بروتين سام او محسس .

وتقوم الجهات المعينة بجهود لإصدار او إنتاج Universal proteome و Universal Metabolome (في المستقبل) كأساس مرجعي Reference frame يشمل جميع

البروتينات والمواد الايضية التي تنتج من الاحياء المخمرة المستعملة في التصنيع الغذائي بالاعتماد على تسلسل الحوامض الامينية وبمقارنتها بمواد سامة او محسسات معروفة .

وكذلك تحديد المستويات العليا والدنيا من المركبات الموجودة في الغذاء ، ولذلك فان أي تغير في البروتينات او تركيزها او تغير في النمط الايضي لأحياء جديدة مهندسة يمكن ان يقارن بالإطار المرجعي والذي سيكون بمثابة بداية لطرق أخرى لتحديد السلامة .

التقييدات في مجال بكتريا حامض اللاكتيك المهندسة وراثيا :

صدرت العديد من النشريات حول الموضوع وخاصة هندسة بكتريا حامض اللاكتيك لتماسها مع الانسان عن طريق المستحضرات الطبية او عن طريق الأغذية وهو الأكثر أهمية ، ولكن قد يبدو ان هناك بعض التناقض بين ما يقبل وبين ما لا يقبل والغاية من التشريعات هو لضمان منع حدوث أي تأثيرات مضرة لصحة الانسان او البيئة .

فمسالة كون الاحياء مسموح بتحويرها هي المعزولة من الانسان والتي تكون ذات تاريخ طويل من آمان الاستعمال هي التي نصت التشريعات على السماح بتحويرها . ولكن الجدل حول الطرق .

وتعد بعض الجهات ان الاحياء المحضرة بالكلونة الذاتية Self cloning لا تعد أحياء محورة وراثيا . ويقصد بالكلونة الذاتية هو ازالتة قطع من الحوامض النووية للخلية او الكائن وإجراء عليه بعض التحويرات الإنزيمية او الكيماوية او غيرها ثم إعادته الى النوع نفسه من الخلايا او الخلية نفسها او خطوط الخلايا نفسها او إدخاله الى أحياء قريبة الصلة من الناحية التطورية Phylogenetically والتي تؤدي الى تبادل المواد الوراثية المدخلة مع جينوم الخلايا المستلمة .

الجهات المشرعة تقبل الاحياء المطفرة بالتطفير العشوائي دون فحوص السلامة وهذا غير ممكن كما تم مناقشته سابقا .

ومن النقاط الاخرى ان الاغذية الحاوية على المواد أنتجت من احياء محورة وراثيا دون وجود الاحياء المحورة وراثيا لا تخضع لتشريعات السلامة .

ولكن نقطة الانطلاق للتشريعات هو مقارنة الاغذية الجديدة الناتجة بالهندسة الوراثية مع الاغذية التقليدية الامينة الاستعمال وهذا ينطبق على الأغذية المحورة او الأغذية المحضرة باستعمال أحياء محورة ، وهذا أدى الى ظهور مفردة جديدة في التشريعات وهي التكافؤ الواقعي Substantial Equivalence ، والتي من بنودها :

- لا تقبل السلالات التي حورت بالبلازميدات ثم اطلق منها البلازميد لأنها تعد من الاحياء المحورة وراثيا ولا يجب ان تطلق الى البيئة .

● لا تقبل السلالات التي فيها مقاومة المضادات الحيوية كواسمات انتخاب خاصة القابلة للانتقال ، وذلك خوفا من انتقالها الى الاحياء الأخرى عن طريق الانتقال الأفقي مؤدية الى قلة قيمة المضادات الحيوية للاستعمال البشري او البيطري .

وما يتعارض مع هذه النقطة والتي يجب ان لا تؤدي الى رفض استعمال واسمات المقاومة للمضادات الحيوية بشكل مطلق ، ان هناك مقاومة تلقائية ضد بعض المضادات ، فبعض الخلايا تحوي مقاومة تلقائية للستربتومايسين نتيجة حدوث طفرة نقطية Point mutation في rRNA ، او المقاومة للريفامبسين Rifampicin نتيجة لطفرة نقطية في الجينات المسئولة عن إنزيم كوثرة RNA polymerase . كما ان هناك بعض بكتريا حامض اللاكتيك المنتجة للـ D- lactate تحمل صفة المقاومة للفانكومايسين . ومثل هذه الظواهر طبيعية الحدوث يجب ان لا تكون سببا في استبعاد مثل هذه السلالات واستعمالها كخلايا مستقبلة في بناء بكتريا حامض اللاكتيك المحورة وراثيا GM-LAB نظرا لان هذه المقاومة او الصفات داخلية وغير قابلة للانتقال . ولكن مع هذا هناك بدائل لصفة مقاومة المضادات الحيوية ومنها :

- استعمال الجين المسئول عن α – galactosidase gene (aga) وهو مشتق من البكتريا *Lc. raffinolactis* ATCC 43920 وعند وضعه في البكتريا *Lc. lactis* و *Pe. acidiladici* يحولها من خلايا غير قادرة على تخمير سكر الميليبايوز الى احياء قادرة على ذلك (Mel^- الى Mel^+) .
- استعمال الجينات *lac F , lac G* والتي عند إدخالها تحول الخلايا غير القادرة على استهلاك اللاكتوز الى أحياء قادرة على استهلاكه كما في *Lc. lactis* NZ 3600 .
- وتوجد واسمات أخرى عديدة مثل استعمال ظاهرة العوز الغذائي .

● السلالات التي تغير صفاتها بتاثير عملية التنبيغ او الاقتران الطبيعية لا تعد من الاحياء المحورة وراثيا .

● ومن النقاط الأخرى تشير التشريعات الى وجوب ثباتية الاحياء المهندسة من الناحية الوراثية . وذلك للحد من عمليات الانتقال الأفقي للصفات والتي تعد من اهم المعوقات بالنسبة للمستهلك والبيئة

والحقيقة ان دخول الجينات الى الاحياء من أحياء بعيدة عنها يحدث بشكل طبيعي ولكن بتردد واطئ جدا مقارنة بعمليات النقل المقصودة . ونقل الجينات على البلازميدات يشكل خطوة أساسية في النقل الأفقي ، ولكن هذه عرضة للفقد نتيجة تحييد البلازميدات وان كان من الممكن الحد من الحالة الأخيرة بتنمية الخلايا تحت ظروف خاصة تمنع خروج البلازميدات . ولكن الأفضل لثباتية الجينات هو إدماجها مع كروموسوم الخلية ، ويكون ذلك عن طريق استغلال عمليات العبور أثناء انقسام

الخلايا وتضاعف DNA ويكون ذلك ممكنا باستعمال بلازميدات لا تتضاعف Non-replicating plasmids ، وبعدها يمكن ان يخرج البلازميد وبذلك فان الخلايا لا تحوي على DNA إضافي .

تنص التشريعات على استبعاد الجينات التى تشفر للامراضية مثل توليد عوامل الضراوة ، او جينات تشفر لانزيمات تشترك في تخليق او انتاج المحسسات او طلائعها فهذه تستبعد تماما كاهداف للهندسة الوراثية .

وتشير التشريعات الى وجوب وجود تعليمات في حالة الحوادث العرضية للمستهلك .

الفحوص اللازمة للأحياء المهندسة وراثيا :

بما ان ادخال DNA غريب الى الخلايا يمكن ان يؤدي الى تخليق مواد جديدة مثل البروتينات ونواتج ايض اخرى لذا وجب الانتباه الى عدة نواحي وفحصها ومنها :

- اجراء مقارنة لتوالي الحوامض الامنية للبروتينات الجديدة ومقارنتها ببروتينات معروفة
- اجراء فحوص السمية ومنها السمية الفموية على البروتينات الجديدة التي لم تستهلك من قبل والاخرى المشابه لبروتينات موجودة وكذلك اجراء فحوص السمية المزمنة و Toxicokinetics .
- دراسة الفعالية المضادة للتغذية للبروتينات الجديدة مثل الكشف عن وجود مثبطات البروتيزات وغيرها .
- دراسة قابلية توليد الحساسية ويمكن كخطوات اولية مقارنة تسلسل الحوامض الامنية للبروتينات الجديدة والمحسسات المعروفة . فاذا كان هناك تشابه بنسبة 35 % في قطعة مكونة من 80 حامض اميني فيجب ان تؤخذ هذه بنظر الاعتبار . ثم دراسة مقاومة البروتينات الجديدة للهضم بالببسين Pepsin وذلك لان معظم المحسسات هي مقاومة للهضم بهذا الانزيم . وكذلك يمكن تحديد مدى توليد الحساسية بشكل غير مباشر من قياس درجة كراهية البروتين للماء . ولا يكتفى بهذا وانما يجب ان تخضع لفحوص الجلد الخاصة بالكشف عن الحساسية ثم الانتقال الى المرحلة النهائية وهي تطبيقها على المتبرعين من البشر .
- دراسة أدائها الايضي ومدى جاهزية البروتينات او المنتجات حيويا .
- دراسة ثباتية البروتين او المنتج للحرارة لمعرفة ثباتيه في عمليات التصنيع والخزن .
- إجراء فحوص قابلية التطفير Mutagenicity وكذلك قابلية توليد السرطانات Carcinogenicity باستعمالها خارج وداخل الأنظمة الحية . ودراسة قابليتها على توليد التشوهات Teratogenicity .

● دراسة تاثيرها على عملية التكاثر والإخصاب .

المراقبة بعد التسويق :

يلاحظ مما تقدم ان المجال واسعا ويحتاج لإجراء العديد من الدراسات الشاملة حتى يمكن ان يتقبل المجتمع الاحياء المهندسة وراثيا وخصوصا بكتريا حامض اللاكتيك والأحياء العلاجية لأنها تمس اهم محورين بالنسبة لحياة الانسان ألا وهي الغذاء والدواء . ولذلك تمتد التشريعات الى ما بعد طرح المنتج للمستهلكين فتفرض عليه مراقبة بعد التسويق .

وتهتم المراقبة بعد التسويق بتسجيل ودراسة التاثيرات الصحية على المستهلك بعد مدة طويلة من إطلاق المنتوج الى الأسواق . والسبب في ذلك انه حتى بعد الحصول على المصادقة على إطلاق الاحياء والسلالات الا انها قد تؤدي الى تاثيرات متأخرة . ومثل هذه المراقبة يجب ان تشمل المجاميع الثانوية في المجتمع مثل المواليد وكبار السن والأشخاص معلولي المناعة وذوي الاحتياجات الخاصة كي تزود بمعلومات إضافية حول طول مدة الاستعمال ، ومثل هذه الإجراءات تتم ايضا على منتجات اخرى عند طرحها . وتقوم بها عادة لجان خاصة مثل تلك الخاصة بتسجيل الأدوية ويكون من أعضائها أطباء .

ومثل هذه المراقبات قد لا تصلح لمدة طويلة خاصة عندما يكون نمط التغذية غير متناسق ولكنها في النهاية قد تقود الى تسجيل استنتاجات حول التأثيرات القوية على صحة الانسان مثل التغييرات الحاصلة في مستوى تناول الاغذية . والمراقبات الكبيرة بحجم المجتمعات يجب ان تتظافر فيها جهود الحكومات والجمعيات وحتى الأشخاص . ومن مهماتها :

1- تسجيل اى شكوى او تاثير جانبي على المستهلك يجذب الانتباه مثل الحساسية الغذائية وغيرها لتنشيط فعالية المتابعة لدى افراد المجتمع .

2- تسجيل مستويات استهلاك الغذاء بالنسبة للمجتمع وهذا يتم بواسطة الجهات الرسمية .

3- إقامة دراسات وبائية موسعة لإيجاد العلاقات بين الأمراض المزمنة والغذاء المطروح .

4- إقامة برامج تعريفية من قبل الشركات المنتجة لتعريف الناس بالفعاليات الحيوية للمنتجات ومدى السلامة المفترضة من استهلاكها قبل طرح المنتجات للأسواق مما يؤدي الى زيادة تقبل المستهلك لها .

5- تعليم الأغذية Labeling والمنتجات وإعلام المستهلك بنشرات مرفقة حول طبيعة الكائنات المهندسة وراثيا والأحياء الطبيعة التي يتناولها .

ومن الوسائل الاخرى لزيادة ثقة المستهلك هو إعلامه عند حصول ضرر من الأغذية الجديدة أي التشهير بالشركة المصنعة ، وعلى الشركات تقبل التشهير والطعن عند حصول تغييرات غير

مرغوب فيها . وعندها يجب احترام الاختيار الحر للمستهلك عند طرح منتجات اخرى ، وذلك لان كل الطروح والتنظيمات والتشريعات تكون مرهونة باستجابة المستهلك .
وعليه كان على الحكومات إقامة برامج للبحوث المدعمة ماليا يكون هدفها تقليل عدم المصداقية والثقة المفقودة في المجتمع ، فالتثقيف يشكل جبهة ملائمة للتقليل من المشاعر العدائية المتعلقة باستعمال الاحياء المحورة وراثيا .

والحقيقة ان وراء عدم المصداقية بل والعدائية في الاتحاد الأوربي هو جماعات السلام Green groups ولجسر الهوة بين المجتمع وجماعات السلام يمكن ان يتم بإنشاء جماعات للأحياء المحورة وراثيا Specific group of GMOs والتي يمكن ان تساعد في تقبل الاحياء المحورة وراثيا مما يؤدي الى تحسين الصحة وحياة أفضل لمجتمعات اليوم .

اما فيما يخص المجتمعات الاخرى ، فالتي قبلت الاحياء المحورة وراثيا كانت تحت ظروف معينة مثل الفقر في البلدان النامية . فالاعتقاد العام ان كل المجتمعات ترفض التغيير الوراثي ذلك لأنه غير محدوس العواقب كما ان التقنيات والتطورات الكبيرة في طرق التحليل لا تزال قاصرة على حدس ما سيحصل بعد عدة أجيال للخلية المحورة ولا زالت هذه النقطة قائمة .

اضافة الى انه في البلدان النامية او غير المتطورة بالدرجة الرئيسة والبلدان المتقدمة والصناعية بالدرجة الثانية لا تزال هناك فرص كبيرة وكبيرة جدا للبحث عن الاحياء الطبيعية ولو صرفت الأموال في هذا المجال لربما كان أفضل من إجراء التغييرات والانتظار لما يحصل .

المراجع

المستعملة وأخرى للمطالعة

References

A

- Aattouri, N. & Lemonnier, D. 1997 .Production of interferon induced by *Streptococcus thermophilus* , role of CD_4^+ and CD_8^+ lymphocytes . Nutr. Biochem **.8** : 25-31.
- Adams, M. & Mateau, P. 1995 . On the safety of lactic acid bacteria from food . Int. Fd. Microbiol. 27 : 263-264.
- Ahmed, A. & Al-:Khafaji, Z. 1987 . Orotic acid consumption by lactic acid bacteria . Iraqi J. Agric. Sci. 18 : 29-46.
- Aiba, Y., Suzuki, N., Kabir, A., Takagi, A. & Koga, Y. 1998. Lactic acid- mediated suppression of *Helicobacter pylori* by the oral administration of *Lactobacillus salivarius* as a probiotic in a gnotobiotic murine model . Am.J. Gastroenterol. **93** : 2097-2101 .
- Al-Ani. L., Al-Khafaji, Z. & Abaas, K. 2000 . Antagonism of vaginal lactobacilli with microbes of vaginosis . 7th Conference of Technical Education Institutes .
- Al-Azawi, S.& Al-Khafaji, Z. 1988 . Effect of diacetyl on the growth of lipolytic bacteria . Iraqi J. Agric. Sci. **19** : 57-68 .
- Al-Baddani, H. 2006 . Effect of *Saccharomyces cerevisiae* Glucan on Acne Treatment . MSc. thesis . Genetic Engineering & Biotechnology Institute for Postgraduate Studies . Univ. of Baghdad, IRQA.
- Al-Ghrbawi, W. 2005 . Antagonism of *Saccharomyces boulardii* towards Bacterial Wound Infections. MSc. thesis . Genetic Engineering & Biotechnology Institute for Postgraduate Studies . Univ. of Baghdad, IRQA.
- Al-Karimi, K. & Al-Khafaji, Z. Effect of diacetyl on bacteria isolated from respiratory tract . Technical J .In press.
- Al-Karimi, K. & Al-Khafaji, Z. Effect of diacetyl on bacteria isolated from contaminated burns and wounds . Technical J .In press.
- Al-Kassab, A & Al-:Khafaji, Z. 1992 . Effect of different factors on the antagonism of enteric lactobacilli with diarrheal enterobacteria . Iraqi J. Agric. Sci.**23** : 18-26 .
- Al-Kassab, A & Al-Khafaji, Z. 1992 . Effect of associated cultural media on enteric lactobacilli and their antagonism towards diarrheal enterobacteria . Iraqi J. Agric. Sci. **23** : 34-41.
- Al-Kassab, A & Al-Khafaji, Z. 1992 . Isolation of enteric lactobacilli from infants and their effect on diarrheal enterobacteria . Iraqi J. Agric. Sci.**23** :42-51.
- Al-Khafaji, Z. 2002 . Effect of ecological factors on inhibitory lactic acid bacteria activities in zabadi . Foundation of Technical Education Institutes . 8th Conference .
- Al-Khafaji, Z., Al-Ani. L.& Al-Karimi, K.2002 . Antagonism of intestinal and vaginal lactobacilli with *Candida albicans* . Iraqi J. Comm. Med. **15**: 6-7.
- Al-Khafaji, Z. & Al-Azawi, S. 1987 . Interaction of *Streptococcus diacetylactis* and lipolytic bacteria . Iraqi J. Agric. Sci. **18** : 33-41.
- Al-Khafaji, Z., Al-Hakak, T., Al-Qadi, M. & Abbul Hameed , R. 2004 . Effect of subculturing and lyophilization on viability and antagonistic activity of *Saccharomyces boulardii* .Iraqi J. Biotechnol. **3** : 98-115 .
- Al-Khafaji, Z.& Al-Karimi, K. Effect of diacetyl on different bacterial isolates from hospitals . Um-Salama Sci. J. In press.

- Al-Khafaji, Z.& Al-Karimi, K. Diacetyl activity towards superficial infection isolates .Technical J .In press.
- Al-Khafaji, Z.& Al-Karimi, K. & Nakash,A . 2002 . Antagonism of cheese lactic acid bacteria towards *Brucella* isolated from cheese . Al-Buhooth Al-Tachaniya . **1/3** : 51-57.
- Al-Khafaji, Z.& Al-Karimi, K. & Nakash,A . 2002 .Effect of raw milk lactic acid bacteria against *Brucella* cheese isolates to be used for production of safe soft cheese . Al-Buhooth Al-Tachaniya . **1/3** : 64-69.
- Al-Khafaji, Z.& Al-Kassab, A . 1990 . Effect of media and pH on growth and survival of *Lactobacillus acidophilus* . Iraqi J. Agric. Sci.**21**: 461-471.
- Al-Khafaji, Z.& Al-Kassab, A . 1990 .Antagonism of lactobacilli with enteropathogens . Iraqi J. Agric. Sci.**21**: 472-484.
- Al-Khafaji, Z . & Al-Omer, M. 1990 . Genetic studies on *Lactobacillus acidophilus* . Iraqi J. Agric. Sci.**21**: 407-418 .
- Al-Khafaji, Z ., Al-Qadi, M., Al-Ani, L.& Al-Hakak, T.2002. Propagation and antagonistic activity of *Saccharomyces boulardii* . Dar-Al-dawa, Al-Arabi .**43**: 1-15.
- Al-Khafaji, Z . & Al-Rubee,R.1998. Mutagenicity and carcinogenicity of Kerati. Al-Mustanssyria J. Sci. **4** : 12-18.
- Al-Khafaji, Z ., Nakash, A., Al-Karimi, K. 2002 . Study of yoghurt lactic acid bacteria effect towards cheese *Brucella* . Al-Buhooth Al-Tachaniya . **1/3** : 58-63.
- Al-Khafaji, Z ., Salih, A.,Abbas, K. & Al-Musawi,A.1998.Antagonistic effect of butter starters towards contaminated flora and their effect on butter quality . . Iraqi J. Agric. Sci.**29**: 389-400.
- AL-Marsoomi ,A., Al-Rubiee , R. & Al-Khafaji,Z. 1999. Mutagenicity and carcinogenicity of Gossypol. Al-Mustanssyria J.Sci.**10**.29-36.
- Armstrong, J., Simske, S., Beharka, A., Balch, S., Luttges, M. & Chapes, S. 1994. Class I and class II major Histocompatibilty molecules play a role in bone marrow-derived macrophage development . J. Leukocyte Biol. **55** : 658-661.
- Arunachalam, K., Gill, H.& Chandra, R.2000. Enhancement of natural immune function by dietary consumption of *Bifidobacterium lactis* (HNO19) . Eur .J. Clin. Nutr. 54: 1-5.
- Aso, Y. Akaza, H. & Kotake, T. 1992 . Prophylactic effect of a *Lactobacillus casei* preparation on the recurrence of superficial bladder cancer. Urol. Int. **49**: 125-129.
- Aso, Y. Akaza, H. , Kotake, T., Tsukamaoto, T. , Imai, K. & Naito, S. 1995. Prevention effect of a *Lactobacillus casei* preparation on the recurrence of superficial bladder cancer in double-blind trial .Eur. Urol. **27** : 104-109.
- Ayebo. A., Shahani, K. & Dan, R. 1981.Antitumor components of yogurt : fractionation . J. Dairy Sci. **64**:2318.
- Ayebo. A., Shahani, K. , Dan, R. & Friend , B. 1982 . Ion exchange separation of the antitumor component (s) of yogurt dialyzate . J. Dairy Sci.65:2388-2390.

B

- Begley, M., Hill, C. & Gahan, C. 2006. Bile salt hydrolase activity in probiotics. Appl .Environ. Microbiol. **72** :1729-1738.

- Belem , M., Gibbs , B . & Lee , .B. 1999 . Proposing sequences for peptides derived from whey fermentation with potential bioactive sites. J. Dairy Sci . **82** : 486 – 493 .
- Bergquist, P. 1987 . Incompatibility *In* " Plasmids" K. G. Hardy (ed). IRL Limited , Oxford , England. Chapter 3.
- Bermúdez-Hunarán, L. Langella, P., Miyosh, A. , Gruss, A., Tanez, R., Oca-Luna, R., & Le Loir,Y. 2002 . Production of human papilomavirus type 16 E7 protein in *Lactococcus lactis* . Appl .Environ. Microbiol. **68**: 917-922.
- Bernet, M. , Brassart, D., Neeser, J.& Servin, A. 1994. *Lactobacillus acidophilus* LA1 binds to cultured human intestinal cell lines and inhibits cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria . Gut **35** : 483-489.
- Bernet, M. ,Lievin, V., Brassart, D., Neeser, J. Servin, A. & Hudault, S. 1997 . The human *Lactobacillus acidophilus* strain LA1 secrets nonbacteriocin antimicrobial substance(s) active *in vitro* and *in vivo* . Appl .Environ. Microbiol. **63**: 2747-2753.
- Biffi, A. , Coradin, D., Larsen, R., Riva, L. & Fronzon, G. 1997. Antiproliferative effect of fermented milk on the growth of human breast cancer cell line . Nutr. Cancer. **28**: 93-99.
- Björkroth, K., Vandamme, P. & Korkeala, H. 1998. Identification and characterization of *Leuconostoc carnosum*, associated with production and spoilage of vacuum, package ,sliced ,cooked ham. Appl .Environ. Microbiol. **64** : 3313-3319.
- Bodana, A. & Rao, D. 1990. Antimutagenic activity of milk fermented by *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* .J. Dairy Sci. **73**:3379.
- Bongaerts, G., Severijnen, R., Tangerman, A., Verrips, A. & Tolboom, J.2000. Bile salt deconjugation by lactobacilli and its effects in patients with short small bowel . J. Gastroenterol. **35**:801-804.
- Bonger, R., Hoefnagel, M. & Kleerebenzen, M. 2005. High-level acetaldehyde production in *Lactococcus lactis* by metabolic engineering . Appl .Environ. Microbiol.**71**: 1109-1113.
- Boucher, I., Parrot, M., Gaudreau, H., Champagne, C., Vadeboncoeur, C. & Moineau, S.2002.Novel food grade plasmid vector based on melibiose fermentation for the genetic engineering of *Lactococcus lactis* . Appl .Environ. Microbiol.**68** :6152-6161.
- Bounous, G., Papenburg, R., Kongsharn, P., Gold,P. & Fleizer,D. 1988. Dietary whey protein inhibits the development of dimethylhydrazine induced malignancy. Clin. Invest. Med. **11** :213-217.
- Brady, L., Gallaher, D. & Busta, F. 2000. The role of probiotic cultures in the prevention of colon cancer. J. Nutr. 130:410S-414S.
- Bullen, C., Tealre, P. & Stewart, M. 1977. The effect of humanized milks and supplemented breast-feeding on the faecal flora of infants . Int. J. Med. Microbiol. **10**:403-413.
- Burton, J., Cadieux, P. & Reid, G. 2003. Improved understanding of bacterial vaginal microbiota of women before and after probiotic instillation. Appl .Environ. Microbiol.**69**: 97-101.
- Butchko, H. , Tschanz, C. & Kotsonis ,F. 1994. Postmarketing surveillance of food additives . Regulatory Toxicol. Pharmacol.**20** :105-118.

C

- Cadieux, P., Burton, J., Gardiner, G., Braunstein, I., Bruce, A., Kaug, C. & Reid, G. 2002.*Lactobacillus* strains and vaginal ecology . JAMA. **287**:1940-1941.
- Campieri, M., Rizzello, F. & Venturi, A. 2000. Combination of antibiotic and probiotic treatment is efficacious in prophylaxis of post-operative recurrence of Croh's disease : a randomized controlled study vs mesalamine . Gastroenterology .**118**: A4179.
- Castagliolo, I., Riegler, M., Valenick, L., LaMont, J. & Pothoulaskis , C. 1999. *Saccharomyces boulardii* protease inhibits the effect of *Clostridium difficile* toxin A and B in human colonic mucosa . Infect. Imm.**67**:302-307.
- Chaves, A., Fernadez, M., Lerayer, A., Mierau, I., Kleerebezem, M. & Hugenholtz, J. 2002. Metabolic engineering of acetaldehyde production by *Streptococcus thermophilus* . Appl .Environ. Microbiol.**68**:5656-5662.
- Cheville, N.2000. Development , testing and commercialization of a new brucellosis vaccine for cattle . Ann. N.Y. Acad. Sci. **916**:147-153.
- Christensen, H., Frokiaer, H. & Pestka, J. 2002. Lactobacilli differentially modulate expression of cytokines and maturation surface markers in murine dendritic cells. J. Immuonol.**168**:171-178.
- Cintas, L. 2001. Review: Bacteriocins of lactic acid bacteria . Fd. Sci. Technol.**7**:281-305.
- Clare , D . & Swaisgood , H . 2000 . Bioactive milk peptides : a prospectus . J . Dairy Sci . **83** : 1187 – 1193 .
- Coconnier, M., Lievn, V., Hemery, E. & Servin, A. 1998. Antagonistic activity against *Helicobacter* infection *in vitro* and *in vivo* by the human *Lactobacillus acidophilus* strain LB . Appl .Environ. Microbiol.**64**:4573-4580.
- Cooper ,G. 2000. The Eukaryotic Cell Cycle . *In* " The Cell a Molecular Approach" 2nd edition. NCBI.

D

- Daigle, A., Roy, D., Belanger, G. & Vuillemard, J. 1999. Production of probiotic cheese (cheddar-like cheese) using enriched cream fermented by *Bifidobacterium infantis* . J. Dairy Sci. **82**:1081-1091.
- Dambekodi,P. & Gilliland < S. 1998. Incorporation of cholesterol in cellular membrane of *Bifidobacterium longum* . J. Dairy Sci.**81**:1818-1824.
- Daniel , S . , Hartman , P . & Allison , M . 1987 . Intestinal colonization of laboratory rats with *Oxalobacter formigenes* . Appl . Environ . Microbiol. **53** : 2767 – 2770 .
- Darouiche, R., Donovan, W. , Del Terzo, ., Thornby, J., Rudy, D.& Hull, R. 2001. Pilot trial of bacterial interference for preventing urinary tract infection. Urology **58**:339-344.
- de Ruyter, P., Kuipers, O., Meijer, W. & de Vos. W. 1997. Food grade controlled lysis of *Lactococcus lactis* for accelerated cheese ripening . Nature Biotechnol. **15**:976-979.
- de Ruyter, P., Kuipers, O.& de Vos. W.1996. Controlled gene expression system for *Lactococcus lactis* with the food-grade inducer nisin . Appl .Environ. Microbiol.**62**:3662-3667.

- De Simone, C., Bianchi, B., Negri., Ferrazzi,, Baldinell,L. & Vesely, R. 1986. The adjuvant effect of yogurt on production of gamma- interferon by Con A stimulated human peripheral blood lymphocytes . Nutr. Rep. Int. **33**:419-433.
- De Vos , W. & Hugenholtz, J 2004. Engineering metabolic highways in Lactococci and other lactic acid bacteria .Trends Biotechnol. **22**:72-79.
- De Vrse, M., Stegelmann, A. & Richter, B. 2001. Probiotic compensation for lactase insufficiency . Am. J. Clin. Nutr. **73**:4215-4229.
- Dieye, Y., Clier, U., Gruss, A. & Piard, J. 2001. Design of a protein-targeting system for lactic acid bacteria . J. Bacteriol. **183**:4157-4166.
- Dieye, Y., Hoekman, A., Clier, U., Juillard , V., Boot, H. & Piard, J.2003. Ability of *Lactococcus lactis* to export viral capsid antigen : a crucial step for development of live vaccines . Appl .Environ. Microbiol.**69**:7281-7288.
- Dodds, K. & Collins-Thompson, D. 1984. Nutritive tolerance and nitrite reduction in lactic acid bacteria associated with cured meat products . Int. J. Fd. Microbiol. **1**:197-204.
- Donnet-Huges, A., Rochat, F & Serrant,P.1999. Modulation of nonspecific mechanism of defense by lactic acid bacteria effective dose. J. Dairy Sci. **82**:863-869.
- Drouault, S., Juste, C., Marteau, P., Renault, P.& Corthier,G. 2002. Oral treatment with *Lactococcus lactis* expressing *Staphylococcus hyicus* lipase enhances lipid digestion in pig with induced pancreatic insufficiency . Appl .Environ. Microbiol.**68**: 3166-3168.
- D'Souza, A., Rajkumar, C., Cooke,J. & Bulpitt, C. 2002. Probiotics in prevention of antibiotic associated diarrhea : meta-analysis . Br. Med. J. **324**:1361.
- Duc, L., Hong, H., Barbosa, T. & Cutting, S. 2004. Characterization of *Bacillus* probiotics available for human . Appl .Environ. Microbiol.**70**:2161-2171.
- Duncan , S . , Richardson , A. , Kaul , P . , Holmes , R . , Allison , M . & Stewart , C . 2002 . *Oxalobacter formigenes* and its potential role in human health . Appl . Environ . Microbiol . **68** : 3841 – 3847 .

E

- Eijsink, V., Axelsson, L., Diep,D., Havarstein, L., Holo, H. & Nes, I. 2002. Production of class II bacteriocins by lactic acid bacteria ; an example of biological warfare and communication. Antoine van Leeuwenhoek.**81**:639-654.
- El-Nezami, H., Kankaanpaa, P., Salminen,S. & Ahokas, J. 1998. Physicochemical alterations enhance the ability of dairy strains of lactic acid bacteria to remove aflatoxin from contaminated media . J. Fd. Prot. **61**:466-468.
- El-Nezami, H., Kankaanpaa, P., Salminen,S. & Ahokas, J.1998. Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind food carcinogens . Fd. Chem. Toxicol. **36**: 321-326.
- El-Nezami, H., Mykkaven, H., Kankaanpaa, P., Salminen,S. & Ahokas, J. 2000. Ability of *Lactobacillus* and *Propionibacterium* strains to remove aflatoxin B from the chicken duodenum. J. Fd. Prot. **63**:549-552.
- El-Nezami, H ., Salminen,S. & Ahokas, J. 1996. Biologic control of food carcinogen using *Lactobacillus* GG. Nutr. Today .31:41-42.

- Essa,R. &Al-Kafaji,Z.1992. Mutagenecity and carcinogenicity of some organic substances used as food preservatives or originally exist in foods. Iraqi J. Agric.Sci.**23**:192-203.
- Enouf, V., Langella, J., Commissaire,J. & Corthier, G. 2001. Bovine rotavirus nonstructural protein 4 produced by *Lactococcus lactis* is antigenic and immunogenic. Appl .Environ. Microbiol.**67**:1423-1428.

F

- Falagas, M., Betsi, G. & Athanasiou, S. 2006. Probiotics for prevention of recurrent vulvovaginal candidiasis : a review. J. Antimicrob. Chemother. **58**:266-272.
- Farmer, R., Shahani, K. & Reddy, G. 1975. Inhibitory effect of yogurt components upon the proliferation of ascites tumor cells. J. Dairy Sci. **58**:787-788.
- Frees, D. & Ingmer, H. 1999. ClpP participates in the degradation of misfolded proteins in *Lactococcus lactis* . Mol. Microbiol. 31:79-87.
- Fuller ,R. 1989. Probiotics in man and animals. J. Appl. Bacteriol. **66**:365-378.
- Fuller ,R.1991. Probiotics in human medicine . Gut **32**:439-442.

G

- Gaeng, S., Scherer, S., Neve, H., & Loessoner, M. 2000.Gene cloning and expression and secretion of *Listeria monocytogens* bacteriophage - lytic enzymes in *Lactococcus lactis* . Appl .Environ. Microbiol. **66**:2951-2958.
- Garneau, S., Martin, N. & Vederas, J. 2002. Tow-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria . Biochime ***84***: 577-592.
- Gilbert, C., Robinson, K., Le Page, R. & Wells, J. 2000. Heterologous expression of an immunogenic pneumococcal type 3 capsular polysaccharide in *Lactococcus lactis* . Infect. Immun.**68**:3251-3260.
- Gill, H. 1998. Stimulation of the immune system by lactic cultures . Int. Dairy J. **8**:535-544.
- Gill, H.2002.Probiotics to enhance anti-infective defense in the gastrointestinal tract . Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol. **17**:755-773.
- Gill, H. , Cross, M. & Rutherfurd, K. 2001. Dietary probiotic supplementation to enhance cellular immunity in the elderly . Br. Biomed. Sci. **58**:94-96.
- Gill, H.& Guarner, F. 2004. Probiotics and human health : a clinical perspective . Post. Med. J. **80**:516-526.
- Gill, H., Rutherfurd, K.& Cross, M. 2001. Dietary probiotic supplementation enhances natural killer cell activity in the elderly : an investigation of age-related immunological changes . J. Clin. Immunol. **21**: 264-271.
- Gilliland, S. 1989. Acidophilus milk products : a review of potential benefits to consumers. J. Dairy Sci.**72** :2483-2494.
- Gilliland, S., Nelson,C. & Maxwell, C. 1982. Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus* . Appl. Environ. Microbiol.**49**:377-381.
- Gilliland, S. & Speck, M. 1977. Deconjugation of bile acids by intestinal lactobacilli. Appl. Environ. Microbiol. **33**:15-18.
- Gionchetti, P., Rizzello, F., Venturi, A. m Brigidi, P., Matteuzzi, D., Bazzocchi, G., Poggioli, M. & Campieri, M. 2000.Oral bacteriotherapy as maintenance treatment in patients with chronic pouchitis : a double- blind , placebo-controlled trial . Gastroenterology **119**:305-309.

- Gronchetti, P. Rizzello, F. & Helwig , U. 2003. Prophylaxis of pouchitis onset with probiotic therapy : a double- blind, placebo- controlled trial. Gastroenterology **124**:1202-1209.
- Goldin, B. , Gualteri, L. & Moore, R. 1996. The effect of *Lactobacillus* GG on the initiation and promotion of DMH- induced intestinal tumors in rats . Nutr. Cancer **25**:197-204.
- Gorach, S. 2000. Probiotics and gastrointestinal health . Am. J. Gastroenterol.**95**:S2-S4.
- Grangette, C., Muller-Alouf, H., Gouderrourt, D., Geoffroy, M., Turneer, M. & Mercenier, A. 2001. Mucosa immune responses and protection against tetanus toxin after intranasal immunization with recombinant *Lactobacillus plantarum* . Infect. Immun. **69**:1547-1553.
- Gratz, S., Mykkänen, H. , Ouwehand , A., Juvonen, R., Salminen, S. & El-Nezami, H.2004. Intestinal mucus alters the ability of probiotic bacteria to bind aflatoxin B1 *in vitro* . Appl. Environ. Microbiol.**70**:6306-6308.
- Grummer, R. & Carroll, D. 1988. A review of lipoprotein cholesterol metabolism : importance to ovarian function . J. Anim. Sci. **66**:160-173.
- Guslandi , M., Mezzi, G. & Sorghi, M. 2000. *Saccharomyces boulardii* in maintenance treatment of Crohn's disease . Dig. Dis. Sci. **45**:1462-1464.

H

- Hague, A. , Elder, D., Hicks, D. & Paresleva, C. 1995. Apoptosis in colorectal tumor cells : induction by the short chain fatty acid butyrate , propionate and acetate and by the bile salt deoxycholate . Int. J. Cancer **60** : 400-406.
- Hajjaj, H., Duboc, P. , Fay, L., Zbinden, I. Mace, K. & Niederberger . 2005. *Asperigllus oryzae* produces compounds inhibiting cholesterol biosynthesis downstream of dihydrolanosterol . FEMS Microbiol. Lett. **242** :155-159.
- Hamilton_Miller, J. 2004. Probiotics and prebiotics in the elderly . Postgrad. Med. J. **80** :447-451.
- Haque , E . & Chande , R . 2006 . Milk protein derived bioactive peptides . [On line] UK .
- Hart, A., Stagg, A. & Frame, M. 2002. The role of the gut flora in the health and disease and its modification as therapy . Aliment. Pharmacol. **16**: 1383-1393 .
- Hashimoto, S., Nomoto, K., Matsuzaki, T., Yokoura, T. & Mutai, M. 1984. Oxygen radical scavenging by peritoneal macrophages and Kupffer cells elicited with *Lactobacillus casei* . Infect. Immun. **44**: 61-67.
- Haskard, C., Binnion, C. & Ahokas, J. 2000. Factors affecting the sequestration of aflatoxin by *Lactobacillus rhamnosus* strain GG . Chem. Biol. Interact. **15**:39-49.
- Haskard, C., El-Nezami, H. , Kankaapaa, P., Salminen, S. & Ahokas, J.2001. Surface binding of aflatoxin B1 by lactic acid bacteria . Appl. Environ. Microbiol.**67**:3086-3091.
- Hass, R., Busch, R., Luciono, L., Reale, E. & Engelhardt, W. 1997.Lack of butyrate is associated with induction of *bax* and subsequent apoptosis in the proximal colon of guinea pig. Gastroenterology **112**: 875-881.

- Hatcher, G. & Lambrecht, R. 1993. Augmentation of macrophage phagocyte activity by cell free extracts of selected lactic acid – producing bacteria . J. Dairy Sci. **76**:2485-2492.
- Hekmat, S., McMahon, D. 1992. Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in ice cream for use as a probiotic food . J. Dairy Sci.**75**:1415-1422.
- Henrikesen, C. , Nilson, D. & Johansen, E. 1999. Industrial applications of genetically modified microorganisms : gene technology at Chr.Hansen A/S . Int .Dairy J. **9**:17-23.
- Hibbs, J., Taintor, R. & Vavrin, Z. 1987. Macrophage cytotoxicity : role of L-arginine deiminase and immunonitrogen oxidation to nitrite. Science **253**:473-476.
- Hill, G.1993. Microbiology of bacterial vaginosis . Am. J. Obstet. Gynecol. **169**:450-454.
- Hirai, O., Fujistu, T., Mori,J., Kikuchi, H., Koda, S., Fujioka, M.& Morimoto, Y. 1987. Antitumor activity of purified arabinogalactan-peptidoglycan complex of the cell wall skeleton of *Rhodococcus lentifragmentus* . J. Gen. Microbiol. **133**:369.
- Hols, P. , Kleerebezem, M., Schanck, A., Ferain, T. , Huhgenholtz, J., Delcour, J. & de Vos, W. 1999. Conversion of *Lactococcus lactis* from homolactic to homoalanine fermentation through metabolic engineering . Nature Biotechnol. **17**: 588-592.
- Hoson, A., Kashina, T. & Kada, T. 1986. Antimutagenic properties of lactic acid cultured milk on chemical and fecal mutagens . J. Dairy Sci.**69** :2237.
- Hosoda, M., Hashimoto, H., Morita, H., Chiba, M. & Hoson, A. 1992. Antimutagenicity of milk cultured with lactic acid bacteria against N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidne . J. Dairy Sci.**75**:976.
- Hughes, V. & Hillier, S. 1990. Microbiologic characteristics of *Lactobacillus* products used for colonization of the vagina . Obstet. Gynecol. **75** :244-248.

I

- Isolauri. E., Arvola,T., Sutas, Y., Moilanen, E. & Salminen, S. 2000. Probiotics in the management of atopic eczema . Clin. Exp. Allergy **30**:1064-1610.
- Isolauri. E., Sutas, Y., Kankaapaa, P. , Arvilommi, H.& Salminen, S.2001. Probiotics : effects on immunity . Am. J. Clin. Nutr. **73**: 444S-450S.

J

- Jay, J. 1996. Modern Food Microbiology . 5th edition . Chapman & Hall. USA.
- Jernigan, M., Miles, R. & Arafa, A. 1985. Probiotics in poultry nutrition: a review. World's Poult. Sci. J. **41** : 99-107.

K

- Kaila,M., Isolauri,E.,Soppi, E., Virtanen, E., Laine,S. & Arvilommi, H. 1990. Enhancement of the circulating antibody secreting cell response in human diarrhea by a human *Lactobacillus* strain. Pediatr. Res.**32**: 141-144.
- Kaizu, M., Sasaki, M., Nakajama, H. & Suzuki, Y. 1993. Effect of antioxidative lactic acid bacteria on rats fed a diet deficient in vitamin E. J. Dairy Sci. **76**: 2493-2499.

- Kalliomaki, M., Salminen,S. , Arvilommi, H., Kero,P., Koskinen,P.& Isolauri. E. 2001. Probiotics in primary prevention of atpoic disease : a randomized placebo-controlled trial. Lancet **350**: 1076-1079.
- Kalliomaki, M., Salminen, S. & Poussa, T. 2003. Probiotic and prevention of atpoic disease : 4- years follow-up of a randomized placebo – controlled trial . Lancet **361**: 1869-1871.
- Karaoglu, S., Aydin, F., Kilic , S. & Kiliç, A. 2003. Antimicrobial activity and characteristics of bacteriocins produced by vaginal lactobacilli. Turk. J. Med. Sci. **33**: 7-13.
- Kerovuo, J .Tynkkynen, S. 2000. Expression of *Bacillus subtilis* phytase in *Lactobacillus plantarum* 755 .Lett. Appl. Microbiol. **30**: 325-329.
- Kim, H. 1998. Characterization of lactobacilli and *Bifidobacterium* as applied to dietary adjuvant . J. Cult. Dairy Prod. 23 :6-9.
- Kim, W. & Dunn, N. 1997. Identification of cold shock gene in lactic acid bacteria and the effect of cold shock on cryotolerance. Curr. Microbiol. **35**: 59-63.
- Kim, J., Kim, S. , Chunge, S., Dae, K., Bor, Y.& Batt, C. 1992. Use of antisense RNA to confer bacteriophage resistance in dairy starter cultures . J. Ind. Microbiol. Biotechnol. **10**: 71-78.
- Kirjavainen, P., Ouwehand, A., Isolauri. E.,& Salminen, S.1998.The ability of probiotic bacteria to bind intestinal mucus . FEMS Microbiol. Lett. **167**: 185-189.
- Klaenhammer, T.1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria FEMS Microbiol. Rev. **12** :39-85.
- Klaver, F. & van der Meer,R. 1993. The assumed assimilation of cholesterol by lactobacilli and *Bifidobacterium bifidum* is due to their bile salt deconjugation activity . Appl. Environ . Microbiol. **59**: 1120-1124.
- Kolars, J.,Levitt, M. & Aouji, M. 1984. Yogurt an autodigesting source of lactase. N. Engl. J. Med. **310**: 1-3.
- Kourkoutas, Y., Bosnea, L., Taboukos, S., Baras, C., Lambrou, D. & Kanellaki, M. 2006. Probiotic cheese production using *Lactobacillus casei* cells immobilized on fruit pieces. J. Dairy Sci. **89**: 1439-1451.
- Kuipers, O., de Ruyter, P., Kleerebezm, M.& de Vos, W. 1998. Quorum sensing-controlled gene expression in lactic acid bacteria J. Biotechnol. **64**: 15-21.
- Kullisaar, T., Zilmer, M., Mikelsaar, T., Vihalemm, H., Annuk, C. & Kilk, A. 2002. Tow oxidative lactobacilli strains as promising probiotics . Int. J. Fd. Microbiol. **72**: 215-224.

L

- Langella, P. & Le Loir, Y. 1999. Heterologous protein secretion in *Lactococcus lactis* : a novel antigen delivery system . Braz. J. Med. Biol. Res. **32**: 191-198.
- Lee, Y., El-Nezami, H., Haskard, A., Gratz, S., Puong, K., Salminen, S. & Mykkänen, 2003. Kinetics of adsorption and desorption of aflatoxin B1 by viable and nonviable bacteria . J. Fd. Prot. **66**: 426-430.
- Lee, K., Lee, S.& Lee, B. 2006. *Asperigllus oryzae* as probiotic in poultry : a review . Int. J. Poul. Sci. **5**: 1-3 .
- Lee, M., Rossel , Y., Wilks, M. & Tabagchali, S. 2001. Expression of *Helicobacter pylori* urease subunit B gene in *Lactococcus lactis* MG 1363 and its use as a

vaccine delivery system against *H. pylori* infection in mice . Vaccine **19**: 3927-3935.

- Le Loir, Y., Gruss, A., Ehrlich, S . & Langella, P. 1994. Direct screening of recombinants in gram- positive bacteria using the secreted staphylococcal nuclease as a reporter . J. Bacteriol. **176**: 5135-5129.
- Le Loir, Y., Gruss, A., Ehrlich, S . & Langella, P.1994. A nine residue synthetic propeptide enhances secretion efficiency of heterologous in *Lactococcus lactis* . J. Bacteriol. **180**: 1895-1903.
- Levander, F., Svensson, M. & Radstrom, P. 2002. Enhanced exopolysaccharide production by metabolic engineering of *Streptococcus thermophilus* . Appl. Environ. Microbiol. **68**: 784-790.
- Lidbeck, A., Nord, C., Gustafsson, J. & Rafter, J. 1992. Lactobacilli, anticarcinogenic activities and human intestinal microflora . Eur. J. Cancer Prev.**5** : 341-353.
- Lik - Amster, H., Rochat, F., Saudan, K. , Mingnot, A. & Aeschlimann, J. Modulation of a specific humoral immune response and changes in intestinal flora mediated through fermented milk intakes . FEMS Immunol. Med. Microbiol. **10**: 55-64.
- Liu, Y., Ekabaram, M., Blum, P., Stimbert, C. & Jernigan, J. 1998. Galactosemic cataractogenesis disturbs intracellular interaction and changes the substrate specificity of choline / ethanolamine kinase. Exp. Eye Res. **67**: 193-202.
- Li, Y. , Hugenholtz , Z., Sybesma, W., Abee, T. & Molenaar, D. 2005 . Using *Lactococcus lactis* for glutathione overproduction . Appl. Microbiol .Biotechnol. **67**: 83-90.
- Lodinnnnnnova-Zadnikova, R., Cukrowska, B. & Tlaskalova- Hagenova, H. 2003. Oral administration of probiotic *Escherichia coli* after birth reduces frequency of allergies and repeated infections later in life (after 10 and 20 years). Int. Arch. Allergy Immunol. **131**: 209-211.
- Lucas, A. & Cole, T. 1990. Breast milk and neonatal necrotizing enterocolitis . Lancet **336**: 1519-1523.

M

- Maassen, C., Holten-Neelen, C., Balk, F., Bak-Glashouwer, M., Leer, R., Laman, J., Boersma, W. & Claassen, E. 2000. Strain- dependent induction of cytokine profiles in the gut by orally administered *Lactobacillus* strains . Vaccine **18**: 2613-2623.
- Mac Dermott, 1996. Alterations of the mucosal immune system in inflammatory bowel disease. J. Gastroenterol. 31: 907-916.
- Madden, J. & Hunter, J.2002. A review of the role of the gut microflora in irritable bowel syndrome and the effects of probiotics. Br. J. Nutr. **88**: S67- S72.
- Madsen, S., Arnau, J., Vrang, A., Givskov, M.& Israelsen, H. 1999. Molecular characterization of the pH inducible and growth phase- dependent promoter P170 of *Lactococcus lactis*. Mol. Microbiol. **32**: 75-87.
- Madsen, K., Cornish, A. & Soper, P. 2001. Probiotic bacteria enhance murine and human intestinal epithelial barrier function . Gastroenterology **121**: 580-591.

- Maeno , M . , Yamamoto , N. & Takano , T . 1996 . Identification of an antihypertensive peptide from casein hydrolysate produced by a proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790 . J . Dairy Sci . **79** : 1316 -1321 .
- Majamaa, H. & Isolauri. E. 1997. Probiotics : a novel approach in the management of food allergy. J. Allergy Clin. Immunol. **99**: 179-185.
- Majamaa, H. & Isolauri. E. & Saxelin, M. 1995. Lactic acid bacteria in the treatment of acute rotavirus gastroenteritis . J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. **20**: 333-338.
- Malchow, h. 1997.Crohn's disease and *Escherichia coli* . J. Clin. Gastroenterol. **25**: 653-658.
- Marteau, P. 2002. Probiotics in clinical conditions. Clin. Rev. Allergy Immunol. **22**: 255-275.
- Marteau, P., Flourie, B. & Pochart, P. 1990. Effect of the microbial lactase (EC 3.2.1.23) activity in yogurt on the intestinal absorption of lactose : an *in vivo* study on lactase deficient humans . Br. J. Nutr. **64**: 71-79.
- Marteau, P., Seksik, P. & Jian, R. 2002. Probiotics and intestinal health effects : a clinical perspective . Br. J. Nutr. **88**: S51- S57.
- Martin, R., Richardson, B., Nyange, P., Lavreys, L., Hiller, S., Chohan, B., Mandaliya, K., Ndinya-Achola, J., Bwayo, J. & Kreiss, J. 1999. Vaginal lactobacilli microbial flora, and risk of human immunodeficiency virus type 1 and sexually transmitted disease acquisition . J. Inf. Dis. **180**: 1863-1868.
- Mashayekh, M. & Brown, R. 1992. Stability of *Lactobacillus delbrueckii* ssp *bulgaricus* , *Streptococcus salivarius* ssp *thermophilus* and β-galactosidase activity in frozen cultured ice cream . Cult. Dairy Prod. J. **27**: 1.
- Mastretta, E., Lohgo, P. & Laccisaglia, A. 2002. Effect of *Lactobacillus* GG and breastfeeding in the prevention of rotavirus nosocomial infections . J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. **35**: 527-531.
- Mastromarino, P., Brididi, P., Macchia, S., Maggi, L., Pirovano , F., Trinchieri,V, Counte, U. & Matteuzzi, D. 2002. Characterization and selection of vaginal *Lactobacillus* strains for the preparation of vaginal tablets . J. Appl. Microbiol. **93**: 884-893.
- Matar , C . , LeBlanc , J . , Martin , L . & Perdigon , G . 2003 . Biologically Active Ppeptides Released in Fermented Milk : Role and Functions . In " Handbook of Fermented Functional Foods " . E . Franworth (Ed.) CRC : Boca Raton , London .
- Matsuzaki, J.& Chin, J. 2000. Modulating immune response with probiotic bacteria . Immunol. Cell Biol. **78** : 67-73.
- McGowan, C. 2003. Regulation of the eukaryotic cell cycle . Prog. Cell Cycle Res. **5**: 1-4.
- McIntosh, G., Regester, G., Le Len, R. & Royle ,P. 1995. Dairy proteins against dimethylhydrazine- induced intestinal cancers in rats . J. Nutr. **125**: 809-816.
- Medaglini, D., Pozzi, G., King, T. & Fischetti, V. 1995. Mucosal and systematic immune responses to a recombinant protein expressed on the surface of the oral commensal bacterium *Streptococcus gordonii* after oral colonization . Proc. Natl. Acad. Sci. **92**: 1931-1939.

- Messina,J.& Lawrence, D. 1990. Milk proteins : precursors of bioactive peptides . Trends Fd. Sci. Tech. **1**: 41-45.
- Messina,J.& Lawrence, D.1989.Cell cycle progression of glutathione- depleted human peripheral blood mononuclear cells is inhibited at S phase . J. Immunol. **143**: 1974-1981.
- Meydani, S. & Ha, W. 2000. Immunologic effects of yogurt . Am. J. Clin. Nutr. **71**: 861-872.
- Midolo, P., Lambert, J., Hull, R., Luo, F. & Grayson, M. 1995. *In vitro* inhibition of *Helicobacter pylori* : NCTC 11637 by organic acids and lactic acid bacteria .J. Appl. Bacteriol. **79**: 475-479.
- Miettinen, M., Lehtonen, A., Julkunen, I. & Matikainen, S. 2000. Lactobacilli and streptococci activate NF- kappa B and STAT signaling pathways in human macrophages J. Immunol. **164**: 3733-3740.
- Miettinen, M., Vuopio-Varkila. J. & Varkila, K. 1996. Production of human tumor necrosis factor- alpha, interleukine-6 and interleukine-10 is induced by lactic acid bacteria . Infect. Immun. **64**: 5403-5405.
- Mikes, Z., Ferenicik, M. & Jahnova, E. 1995. Hypocholesterolemic and immunostimulatory effects of orally applied *Enterococcus faecium* M-74 in man . Folia Microbiologica **40**: 639-646.
- Mittal, G. 1992. Food Biotechnology. Technomic Publishing Comp. Basel.
- Modler, H, Mckellar, R. & Goff, H. 1990. Using ice cream as a mechanism to incorporate Bifidobacteria and fructooligosaccharides into the human diet . Cult. Dairy Prod. J. **25**:4.
- Morotomi ,M.& Mutai, M. 1986. *In vitro* binding of potent mutagenic pyrolysates . J. Natl. Cancer. Inst. **77**: 195-1-201.

N

- Nadathur, S., Gould, S. & Bakalinsky, A. 1994. Antimutagenicity of fermented milk. J. Dairy Sci. **77**: 3287-3295.
- National Cancer Institutes . 2003. Understanding the Immune System. NIH. Publication No. 03-5423.
- Nettleton,J., Greany, K., Thomas, W., Wangen, K., Adlercreutz, H. & Kurzer, M. 2004. Plasma phytoestrogens are not altered by probiotic consumption in postmenopausal women with and without a history of breast cancer. J. Nutr. **134**: 1998-2003.
- Nga, B. 2005. Genome analysis of lactic acid bacteria in food fermentations and biotechnological applications . Curr. Opinion Microbiol. **8**: 307-312.
- Noh, D., Kim, S. & Gilliland, S. 1997. Incorporation of cholesterol into the cellular membrane of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121 . J. Dairy Sci. **80**: 3107-3113.
- Norton, P., Brown, H., Wells, J., Macpherson, A., Wilson, P. & Le Page, R. 1996. Factors affecting the immunogenicity of tetanus toxin fragment C expressed in *Lactococcus lactis* . FEMS Immunol. Med. Microbiol.**14**: 167-177.
- Norton, P., Wells, J., Brown, H., Macpherson, A.,& Le Page, R.1997. Protection against tetanus toxin in mice nasally immunized with recombinant *Lactococcus lactis* expressing tetanus toxin fragment C . Vaccine **15**: 616-619.

- Nouaille, S., Ribriro, L., Miyosh, A., Pontes,D., Le loir, Y., Oliveira, S., Langella , P. & Azevedo, V. 2003. Heterologous protein production and delivery system for *Lactococcus lactis* . Gene. Mol. Res. **2** : 102-111.

O

- Oatly, J., Rarick, M. , Ge, J. & Je, L. 2000. Binding of aflatoxin B1 to bifidobacteria *in vitro* . J. Fd. Prot. **63**: 1133-1136.
- Ocana , V., Holgado, A. & Nader-Macias, M. 1999. Selection of vaginal H_2O_2 – generating *Lactobacillus* species for probiotic use . Curr. Microbiol. **38**: 279-284.
- Ocana , V., & Nader-Macias, M. 2004. Production of antimicrobial substances by lactic acid bacteria II : screening of *Lactobacillus* strains with probiotic purposes and characterization of *Lactobacillus* bacteriocin. Meth. Mol. Biol. **268**: 347-353 .
- Oda, M., Hasegawa, H., Komatsa, S., Kambe, M. & Tsuchiya, F. 1983 . Anti-tumor polysaccharide from *Lactobacillus* species . Agric. Biol. Chem. **47**: 1623.
- Oliveira, S. & Splitter, G. 1996. Immunization of mice with recombinant L7/L12 ribosomal protein confers protection against *Brucell abortus* infection . Vaccine **14**: 959-962.
- Orrhage, K., Sillerström, E., Gustafsson, J., Nord, C. & Rafter, J. 1994. Binding of mutagenic heterocyclic amines by intestinal lactic acid bacteria . Mut. Res. **311**: 239-248.

P

- Peltonen, K., El-Nezami, H., Haskard, C.,Ahokas, C. & Salminen, S. 2001. Aflatoxin B1 binding by dairy strains of lactic acid bacteria . J. Dairy Sci. **84**: 2151-2156.
- Perdigon, G., Alvarez S. & Holgado,A. 1991. Immunoadjuvant activity of oral *Lactobacillus casei* : influence of dose on the secretory immune response and protective capacity in intestinal infections . J. Dairy Sci. **58** : 485-496.
- Perdigon, G., Alvarez S., Rachid, M., Agureo, G. & Gobbato, N. 1995. Immune system stimulation by probiotics. J. Dairy Sci. **78**: 1597-1606.
- Pereira, D. & Gibson ,G. 2002. Cholesterol assimilation by lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from the human gut. Appl. Environ. Microbiol.**68**: 4689-4693.
- Pessi, T., Sutas, Y. &Hurme, M. 2000. Interleukin -10 generation in atpoic children following oral *Lactobacillus rhamnosus* GG. Clin. Exp. Allergy **30**: 1804-1808.
- Piard, J., Jimenez-Diaz, R., Fischetti, V., Ehrich, S. & Gruss, A. 1997. The M6 protein of *Streptococcus pyogenes* and its potential as a tool to anchor biologically active molecules at the surface of lactic acid bacteria . Adv. Exp. Med. Biol. **418**: 545-550.
- Pirzer, U., Schönhaar, A. & Fleischer, B. 1991. Reactivity of infiltrating T lymphocytes with microbial antigens in Crohn's disease . Lancet **338**: 1238-1239.
- Pochart, P., Dewit, O., Desjeux,J. & Bourlioux, P. 1989. Viable starter culture, beta- galactosidase activity, and lactose in duodenum after yogurt ingestion in lactase- deficient humans . Am. J. Clin. Nutr. **49**: 828-831.

- Puri, R., Rattan , A., Bijlani, R., Mahapatra, S. & Nath, I. 1996. Splenic and intestinal lymphocyte proliferation response in mice fed milk or yogurt and challenged with *Salmonella typhimurium* . Int. J. Fd. Sci. Nutr.**47**: 391-398.

R

- Rafter, J. 2002 . Lactic acid bacteria and cancer, Br. J. Nutr. **88**: 89-94.
- Rangavajhyala, N., Shahani, M., Sridevi, G.& Srikumaran, S. 1997. Nonlipopolysaccharide component(s) of *Lactobacillus acidophilus* stimulates the production of intrleukin-1 and tumor necrosis factor- alpha by murine macrophages . Nutr. Cancer **28**: 130-134.
- Rautara, S., Kalliomoaki. M. & Isolauri, E. 2002.Probiotics during pregnancy and breastfeeding might confer immunomodulatory protection against disease in the infant. J. Allergy Clin, Immunol. **109**: 119-121.
- Reddy, G., Friend, B., Shahnai, K. 7 Farmer, R. 1983. Antitumor activity of yogurt components . J. Fd. Prot. **46**: 159-164.
- Reddy, B.& Rivenson, A. 1993. Inhibitory effect of *Bifidobacterium longum* on colon , mammary, and liver carcinogenesis induced by 2-amino-3-methylimidazo[4.5-f] quinoline , a food mutagen. Cancer Res. **53**: 3914-3918.
- Reid, G. 2000. *In vitro* analysis of a dairy strain of *Lactobacillus acidophilus* NCFMTA as a possible probiotic for the urogenital tract . Int. Dairy J. **10**: 415-419.
- Reid, G.2002. Safety of *Lactobacillus* strains a probiotic agents . Clin. Infect. Dis. **35**: 349-350.
- Reid, G., Beuerman, O., Heinemann, C. & Bruce, A. 2001. Probiotic *Lactobacillus* dose required and maintain a normal vaginal flora . FEMS Immunol. Med. Microbiol. **32**: 37-41.
- Reid, G., & Bruce, A.2001. Selection of *Lactobacillus* strains for urogenital probiotic applications . J. Infect. Dis. **183** : S77-S80.
- Reid, G., Bruce, A., Fraser, N., Heinemann, C., Owen,J.& Henning, B. 2001. Oral probiotics can resolve urogenital infection . FEMS Immunol. Med. Microbiol.**30**: 49-52.
- Reid, G., Jass, J., Sebulsky, M. & McCormick, K. 2003. Potential use of probiotics in clinical practice . Clin. Microbiol. Rev. **16**: 658-672.
- Reid, G., Killsap, K. & Bruce, A. 1994. Implantation of *Lactobacillus casei* var *rhamnosus* into vagina . Lancet **344**: 1229.
- Renault, P. 2002. genetically modified lactic acid bacteria applications to food or health and risk assessment . Biochimie **84**: 1073- 1087.
- Riberio, L., Azevedo, V., Le Loir, Y., Oliveira, S., Dieye, Y., Piard, J., Gruss, A. & Langella, P. 2002 . Production and targeting of *Brucella abortus* antigen L7/L12 in *Lactococcus lactis* : a first step towards food-grade live vaccine against brucellosis . Appl. Environ. Microbiol. **68**: 910-916.
- Robinson , R. 2002. Dairy Microbiology . 3rd edition . Wiley- Interscience . New York.
- Ruseler-van Embden, J., van Lieshout, M., Gosselink, M. & Marteau, P. 1995. Inability of *Lactobacillus casei* strain GG, *Lb. acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* to degrade mucus glycoproteins : clearing the way for mucosal protective therapy . Scand. J. Gastroenterol.**30**: 675-680.

S

- Salminen, S.& von Wright, A. 1993. Lactic Acid Bacteria . Marcel Dekker. New York.
- Sato,K., Saito, H. & Tomioka, H. 1988. Enhancement of host resistance against *Listeria* infection by *Lactobacillus casei*: activation of liver macrophages and peritoneal macrophages by *Lactobacillus casei* . Microbiol. Immunol. **32**: 689-698.
- Schaafsma, G., Meuling, W. & van Dokkum, W. 1998. Effects of a milk products, fermented by *Lactobacillus acidophilus* and with fructo-oligosaccharides added, on blood lipids in male volunteers . Eur. J .Clin. Nutr. **52**: 436-440.
- Scheppler, L., Vogel, M., Zuercher, A., Zuercher, M., Germond, J., Miescher,S. & Stadler, B. 2002. Recombinant *Lactobacillus johnsonii* as a mucosal vaccine delivery vehicle . Vaccine **20**: 2913-2920.
- Schiffrin, E., Brassart, D., Servin, A., Rochat, F. & Donnet-Hughes, A. 1997.Immune modulation of blood lymphocytes in human by lactic acid bacteria : criteria for strain selection .Am. J Clin. Nutr. **66**: 515S-520S.
- Shanahan, F. 2000. Immunology , therapeutic manipulation of gut flora . Science **289**: 1311-1312.
- Sherman, P., Johnson-Henry, K., Yeung, H., Ngo, P., Goulet, J. & Tompkins, T. 2005. Probiotics reduced enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and enteropathogenic *E. coli* O127:H6 induced changes in polarized T84 epithelial cell monolayers by reducing bacterial adhesion and cytoskeletal rearrangements . Infect. Immun. **73** : 5183-5188.
- Shida, K., Makino, K. & Morishita, A. 1998. *Lactobacillus casei* inhibits antigen induced IgE secretion through regulation of cytokine production in murine splenocyte cultures . Int. Arch. Allergy Immunol. **115**: 278-287.
- Shida, K., Kiyoshima-Shibata, J., Nagaoka, M., Watanabe, K. & Nanno, M. 2006. Induction of interleukin -12 by *Lactobacillus* strains having a rigid cell wall resistant to intracellular digestion . J. Dairy Sci. **89**: 3306-3317.
- Siegers, K., Entian, K. 1995. Genes involved in immunity to the lantibiotic nisin produced by *Lactococcus lactis* 6F3 .Appl. Environ. Microbiol. **61**: 1082-1089.
- Siegers, K., Heinzmann, S. & Entian, K.1996. Biosynthesis of lantibiotic nisin .Post-translational modification of its prepeptide occurs at a multimeric membrane- associated lantibiotic synthetase complex . J. Biol. Chem. **271** : 12294-12301.
- Sipsas, N., Zonios, D. & Kordossis, T. 2002. Safety of *Lactobacillus* strains used as probiotic agents. Clin. Infect. Dis. **34**: 1283-1285.
- Smiley, R. & Draughon, F. 2000. Preliminary evidence that degradation of aflatoxin B1 by *Flavobacterium aurantiacum* is enzymatic . J. Fd. Prot. **63**: 415-418.
- Solis-Pereyra, B. & Lemonnier, D.1991. Induction of 2'-5' A synthetase activity and interferon in humans by bacteria used in dairy products .Eur. Cytokine Netw. **2**: 137-140.

- Songisepp, E., Kullisaar,T., Hütt, P., Elias, P., Brilene, T., Zilmer, M. & Mikelsaar, M. 2004. A new probiotic cheese with antioxidative and antimicrobial activity . J. Dairy Sci. **87**: 2017-2023.
- Steidler, L., Hans, W. , Schotte, L., Neirynck, S., Obemeier, F., Falk, W., Fiers, W. & Remaut, E. 2000. Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin -10. Science **289**: 1352-1355.
- Steidler, L., Robinson, K., Chamberlain, L., Schofield, K., Remout, E., Le Page, R.7 Wells, J. 1998. Mucosal delivery of murine interleukin-2 (IL-2) and IL-6 by recombinant strains of *Lactococcus lactis* coexpressing antigen and cytokine . Infect. Immun. **66**: 3183-3189.
- Stein, J., Schröder, O., Bonk, M., Oremek, G., Lorenz, M. & Caspary, W. 1996. Induction of glutathione-S- transferase-Pi by short chain fatty acids in the intestinal cell line Caco-2. Eur. J. Clin. Invest. **26**: 84-87.
- Stewart-Tull, D. 1980. The immunological activities of bacterial peptidoglycan .Annu. Rev. Microbiol.**34**: 311-340.
- Sturino,J. & Klaenhammer, T. 2002. Expression of antisense RNA targeted against *Streptococcus thermophilus* bacteriophages . Appl. Environ. Microbiol. **68**: 588-596.
- Surawicz, C., Elmer, G., Speelman, P., McFarland, L., Chinn, J. & van Belle, G. 1989. Prevention of antibiotic-associated diarrhea by *Saccharomyces boulardii* : a prospective study . Gastroenterology **96**: 981-988.
- Sybesma, W., Starrenburg, M., Kleerebezem, M., Mierau, I., de Vos , W. & Hugenholtz, J. 2003. Increased production of folate by metabolic engineering of *Lactococcus lactis* . Appl. Environ. Microbiol. **69**: 3069-3076.
- Sybesma, W., Hugenholtz, J., de Vos , W. & Smid, E. 2006. Safe use of genetically modified lactic acid bacteria in food, bridging the gap between consumers, green groups and industry . Microbiol. Biotechnol. **9** : In press .
- Szajewska, H. & Mrukowicz, J. 2001. Probiotics in the treatment and prevention of acute infectious diarrhea in infants and children : a systematic review of published randomized, double- blind, placebo- controlled trials . J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. **33**: S17-S25.
- Szajewska, H., Kotowaka, M. & Mrukowicz, J.2001. Efficacy of *Lactobacillus* GG in prevention of nosocomial diarrhea in infants . J. Pediatr. **138**: 361-365.

T

- Taha,T., Hoover, D., Dalladetta, G., Kumwenda, N., Mtimavalye, L., Liomba, G., Braadhead, L., Chiphangwi, J. Miotti, P. 1998. Bacterial vaginosis and disturbances of vaginal flora : association with increase acquisition of HIV . AIDS **12**: 1699-11706.
- Tamboli, C., Caucheteux, C. & Cortot , A. 2003.Probiotics in inflammatory bowel diesae : a critical review. Best Practical Res. Clin. Gastroenterol. **17**: 805-820.
- Tangney, M. & Fitzgerald, G. 2002. *AbiA* a lactococcal abortive infection mechanism functioning in *Streptococcus thermophilus* . Appl. Environ. Microbiol. **68**: 6388-6391.
- Taranto, M., Medici., Perdison, G., Holgado, A. & Valdez, G. 2000. Effect of *Lactobacillus reuteri* on the prevention of hypercholesterolemia in mice . J. Dairy Sci. **83**: 401-403.
- Teitelbaum, J. & Walker, W. 2002. Nutritional impact of pre- and probiotic as protective gastrointestinal organisms . Annu. Rev. Nutr. **22**: 107-138.
- Ten Brink, B., Damink, C., Joosten, H. & Huis, I. 1990. Occurrence and formation of biologically active amines in foods . Int. J. Fd. Microbiol. **11**: 73-84.
- Tohill, B., Heilig, C., Klein, R., Rompalo, A. & Cu-Univ, S. 2004. Vaginal flora morphotypic profiles and assessment of bacterial vaginosis in women at risk for HIV infection .Infect. Dis. Obstet. Gynecol. **12**: 121-126.
- Trappic, C., Change, C. & Halpern. G. 1993. The influence of chronic yogurt consumption on populations of young and elderly adults . Int. J. Immunother. **9** : 53-64.
- Tsuru, S., Shinomiya, N., Taniguchi, M., Shimazaki, H., Tanigawa, K., Nomoto, K. 1988.Inhibition of tumor growth by dairy products . J. Clin. Lab. Immunol. **25**: 177-183.

U

- Usman, H. 1999. Bile tolerance, taurocholate deconjugation, and binding of cholesterol by *Lactobacillus gasseri* strains . J. Dairy Sci. **82**: 243-248.

V

- Van Asseldonk, M., Rutten , G., Oteman, m., Siezen, R., de Vos, W. & Simon, G. 1990. Cloning of *usp45* , a gene encoding a secreted protein form *Lactococcus lactis* ssp *lactis* MG 1363. Gene **95**: 155-160.
- Van de Perre, P. 2003. Transfer of antibody via mother's milk . Vaccine **21**: 3374-3376.
- Van't Veer, P., van Leer, E. & Rietdijk, A. 1991. Combination of dietary factors in relation to breast- cancer occurrence . Int. J. Cancer **47**: 649-653.
- Vaughan, E., Bogaard , P., Catzeddu, P., Kuipers, O. & de Vos, W. 2001. Activation of silent *gal* gene in the *lac-gal* regulon of *Streptococcus thermophilus* . J Bacteriol. **183**: 1184-1194.
- Verhelst, R., Verstraelen, G., Verschraegen, G., Simaey, L. Ganck, C., Backer, D., Temmerman, M. & Vaneechoutte , M. 2005. Comparison between gram stain and culture for the characterization of vaginal microflora : definition of distinct grade the resembles grade I microbiota and categorization of grade I microflora . BMC Microbiol. **5**: 61-78.

- Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P. & Verstraete,2000. Probiotic agents in aquaculture . Microbiol. Mol. Biol. Rev. **64**: 655-671.
- Vidal, K., Donnet-Hughes, A. & Granato, D. 2002. Lipoteichoic acids from *Lactobacillus johnsonii* La1 and *Lactobacillus acidophilus* strain La10 antagonize the responsiveness of human intestinal epithelial HT29 cells to lipopolysaccharide and gram-negative bacteria . Infect. Immun. **70**: 2057-2064.
- Von der Weid, T., Bulliard, C. & Schiffrin, E. 2001. Induction by a lactic acid bacteria of a population of CD_4^+ T cells with low proliferation capacity that produce transforming growth factor and IL-10. Clin. Diagnost. Lab. Immunol. **8**: 695-701.

W

- Walker, W. 2000. Role of nutrients and bacterial colonization in the development of intestinal host defense . J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. **30**: S2-S7.
- Walker, D. & Gilliland , S. 1993. Relationships among bile tolerance, bile salt deconjugation and assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus* . J. Dairy Sci.**76**: 956-961.
- Wells, J., Norton, P. & Le Page. R. 1995. Progress in the development of mucosal vaccine based on *Lactococcus lactis* . Int. Dairy J. **5**: 1071-1079.
- Wells, J., Robinson, K., Chamberlain, L., Schofield, K. & Le Page. R. 1996 . Lactic acid bacteria as vaccine delivery vehicles . Antoine Leeuwenhoek **70** : 317-330.
- Wheeler, J., Shema, S. & Bogle, M. 1997. Immune and clinical impact of *Lactobacillus acidophilus* on asthma . Ann. Allergy Asthma Immunol. **97**: 229-233.
- Wollowski. I., Rechkemmer, G. & Pool-Zobel, B. 2001. Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer. Am. J .Clin. Nutr. **73**: 451S-455S.

X

- Xiao, J., Kondo, S., Takahashi. N., Miyaji, K., Oshida, K., Hiramatsu, A., Iwatsui, K., Kokubo, S. & Hosono, A. 2003. Effect of milk products fermented by *Bifidobacterium longum* on blood lipids in rats and healthy male adult volunteers. J. Dairy Sci.**86**: 2452-2461.
- Xin, K., Hoshino, Y., Toda, Y., Igima, S., Kojima, Y., Jouna, N., Ohba, K., Kushiro, A., Kiwaki, M., Hamajima, K.& Kinman, D.2003. Immunogenicity and protective efficacy of orally administrated recombinant *Lactococcus lactis* expressing surface- bound HIV Env. Blood **102**: 223-228.
- Xu, J. & Verstraete, W. 2001. Evaluation of nitric oxide production by lactobacilli . Appl. Environ. Microbiol. **56**: 504-507.

Y

- Yamamoto , P . , Maeno , M . & Takano , T . 1999 . Purification and characterization of an antihypertensive peptides from yoghurt – like product fermented by *Lactobacillus helveticus* CPN4 . J . Dairy Sci . **82** : 1388 – 1393 .
- Yoshida, S. & Xiuyun, Y. 1992. The binding ability of bovine milk caseins to mutagenic heterocyclic amines. J. Dairy Sci. **75**: 958.
- Young, E.1995. An overview of human brucellosis. Clin. Infect. Dis. **21**: 283-289.

Z

- Zarate, G., Juárez , M. & Nader-Macias, M.2005. Effect of some pharmaceutical expcipients on the survival of probiotic vaginal lactobacilli . Can. J. Microbiol. **51**: 483-489.

- Zhang , X.& Ohta, Y.1990. Antimutagenicity and binding of lactic acid bacteria from a Chinese cheese ti mutagenic Pyrolyzates . J. Dairy Sci.**73**: 2702-2710.
- Zhang , X.& Ohta, Y. 1991. *In vitro* binding of mutagenic Pyrolyzates to lactic acid bacteria cells in human gastric juice . J. Dairy Sci. **74**: 752-757.
- Zhang, X.& Ohta, Y. 1991. Binding of mutagens by fractions of the cell wall skeleton of lactic acid bacteria . J. Dairy Sci.**74**: 1477-1481.

الفهـــــــــارس

أ

ب

A

B

C

H

F

G

K

L

I

M

O

N

T

رقم الايداع في دار الكتب والوثائق ببغداد 84 لســــــــنة 2008

Republic of Iraq
Ministry of Higher Education
& Scientific Research
University of Baghdad
Institute of Genetic Engineering &
Biotechnology for Postgraduate Studies

Probiotics

(for life)

Dr. Zahra M. Al-Khafaji

2008